

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR KINDER- UND JUGENDMEDIZIN
PROF. DR. MICHAEL MELTER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**CHOLESTATISCHE ERKRANKUNGEN IM FRÜHEN KINDESALTER: ANALYSE
DER EXPRESSION VON HEPATOBILIÄREN TRANSPORTERN UND
NUKLEÄREN REZEPTOREN**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Victoria Cisar

2019

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR KINDER- UND JUGENDMEDIZIN
PROF. DR. MICHAEL MELTER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**CHOLESTATISCHE ERKRANKUNGEN IM FRÜHEN KINDESALTER: ANALYSE
DER EXPRESSION VON HEPATOBILIÄREN TRANSPORTERN UND
NUKLEÄREN REZEPTOREN**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Victoria Cisar

2019

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Weiß

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Christa Büchler

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2019

Inhalt

1. Einleitung	7
1.1. Die Leber als größtes Stoffwechselorgan des Menschen	7
1.2. Gallebildung und –sekretion.....	8
1.2.1. Gallensäurebildung	8
1.2.2. Bilirubinstoffwechsel	9
1.2.3. Exportsysteme in Hepatozyten und Cholangiozyten	9
1.2.4. Enterohepatischer Kreislauf.....	11
1.2.5. Biotransformation in der Leber.....	12
1.2.6. Nukleäre Rezeptoren.....	12
1.3. Cholestase.....	13
1.3.1. Obstruktive Ursachen.....	14
1.3.2. Hepatozelluläre Ursachen	16
1.3.3. Pruritus als Symptom der Cholestase	17
1.4. Aktueller Stand der Forschung	18
2. Fragestellung der Arbeit.....	21
3. Material und Methoden	22
3.1. Kindergewebeproben.....	22
3.2. Datenerhebung zu den Gewebeproben	23
3.2.1. Daten aus SAP	23
3.2.2. Fragebogen an die Familien.....	25
3.2.3. Daten der klinischen Chemie	26
3.3. RNA-Isolation	26
3.4. Qualitätskontrolle der totalen RNA	28
3.5. Genexpressionsmessung.....	30
3.6. Statistische Auswertung	33
4. Ergebnisse	36
4.1. Charakterisierung der Gewebeproben	36
4.1.1. Klinische Parameter	36
4.1.2. Histopathologische Parameter	38
4.1.3. Laborchemische Parameter	39

4.1.4. Cholestatische Symptome	42
4.2. Expression hepatobiliärer Transporter und nukleärer Rezeptoren in cholestatischen Gewebeproben und Vergleichsproben	44
4.2.1. Basolaterale Aufnahmetransporter.....	45
4.2.2. Kanalikuläre Effluxmechanismen und Cholangiozytentransporter	45
4.2.3. Basolaterale Effluxmechanismen.....	46
4.2.4. Nukleäre Rezeptoren.....	48
4.3. Korrelation der mRNA-Expression von nukleären Rezeptoren und hepatobiliären Transportern und mögliche regulatorische Zusammenhänge.....	49
4.4. Korrelation von laborchemischen, histopathologischen und klinischen Parametern mit der mRNA-Expression der hepatobiliären Transporter und nukleären Rezeptoren.....	53
4.4.1. Laborchemische Parameter	53
4.4.2. Histologische Parameter	56
4.4.3. Klinische Parameter	63
4.5. Einfluss herkömmlicher Antipruritus-Medikamente auf die mRNA-Expression der hepatobiliären Transporter und nukleären Rezeptoren.....	67
5. Diskussion	71
5.1. Charakterisierung der Gewebeproben	71
5.2. Expression hepatobiliärer Transporter und nukleärer Rezeptoren in cholestatischen Gewebeproben und Vergleichsproben	77
5.3. Korrelation der mRNA-Expression hepatobiliärer Transporter mit laborchemischen Parametern und mit der mRNA-Expression nukleärer Rezeptoren	82
5.4. Korrelation von histopathologischen und klinischen Parametern mit der mRNA-Expression der hepatobiliären Transporter und nukleären Rezeptoren.....	86
5.5. Einfluss herkömmlicher Antipruritus-Medikamente auf die mRNA-Expression der hepatobiliären Transporter und nukleären Rezeptoren.....	92
6. Zusammenfassung.....	95
7. Literaturverzeichnis.....	98
8. Abbildungsverzeichnis	102
9. Tabellenverzeichnis	104
10. Anhang	105
11. Danksagung.....	119

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria/ Arterie
ABC	ATP-Binding-Cassette
ALGS	Alagille-Syndrom
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BA	Biliäre Atresie/ Extrahepatische Gallengangatresie
Bili	Bilirubin
BSEP	Bile-Salt-Export-Pump
CAR	Constitutive-Androstane-Rezeptor
cDNA	complementary-DNA
CF	Cystische Fibrose
CFLD	Cystic Fibrosis-associated Liver Disease
CFTR	Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator
CHE	Cholinesterase
CK	Cholestatiches Kollektiv
CRP	C-reaktives Protein
CS	Caroli-Syndrom
CT	Threshold-Cycle
CYP	Cytochrom-P450-Enzym
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FIC1	Familial-Intrahepatic-Cholestasis-Protein 1
FXR	Farnesoid-X-Rezeptor
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GS	Gallensäure(n)
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
LDH	Laktatdehydrogenase
MDR	Multiple-Drug-Resistance-Protein
miRNA	micro-RNA
mM	Millimolar
mRNA	messenger-RNA
MRP	Multidrug-Resistance-Related-Protein

NR	Nukleäre(r) Rezeptor(en)
NTCP	Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide
OATP	Organic-Anion-Transporting-Polypeptide
OST	Organic-Solute-Transporter
PB	Phenobarbital
PBC	Primär Biliäre Zirrhose/ Cholangitis
PFIC	Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase
PXR	Pregnane-X-Rezeptor
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion
RIN	RNA Integrity Number
RMP	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SHP	Small-Heterodimer-Partner
SULT	Sulfotransferase
TPN	Totale Parenterale Nutrition/ Ernährung
UDCA	Ursodeoxycholsäure
UDP	Uridindiphosphat
UGT	UDP-Glucuronyltransferase
V.	Vena/ Vene
VLDL	Very-Low-Density-Lipoprotein
VP	Vergleichsproben/ Kontrollproben/ Normalgewebeproben
γ GT	Gamma-Glutamyl-Transferase

1. Einleitung

1.1. Die Leber als größtes Stoffwechselorgan des Menschen

Die Leber hat als größtes inneres Organ des Menschen ihren Sitz im rechten Oberbauch und ist beim gesunden Menschen fast vollständig vom Brustkorb verdeckt (1). Als zentrales Stoffwechselorgan des Körpers kommen ihr lebenswichtige Synthese-, Abbau- und Entgiftungsfunktionen zu (2). Aufgrund ihrer daraus resultierenden, außergewöhnlichen Stoffwechselintensität fließt rund $\frac{1}{4}$ des Herzminutenvolumens durch die Leber (3). Sie erhält eine doppelte Blutversorgung aus zwei Gefäßsystemen: 25% des Blutes gelangt aus dem systemischen Kreislauf über die Arteria (A.) hepatica zur Leber und ist daher sauerstoffreich, während die restlichen 75% des Blutes der Leber über die Vena (V.) portae zugeführt werden. Diese drainiert venöses, nährstoffreiches, jedoch sauerstoffarmes Blut aus dem Gastrointestinaltrakt, einschließlich Pankreas, Milz und dem abdominellen Fettgewebe zur Leber (3, 4). Auf diese Weise unterliegen fast alle aus der Nahrung resorbierten Bestandteile einem First-Pass-Mechanismus durch die Leber, bevor sie dem Systemkreislauf zugeführt werden. Verantwortlich für nahezu alle Stoffwechselprozesse sind die Hepatozyten, die in der Leber ein Trabekelwerk bilden. Mit ihrer basolateralen Seite grenzen sie an die Sinusoide, in die das Blut aus der A. hepatica und der V. portae mündet, während ihre apikale Seite die blind endenden Gallekanalikuli umgibt (4).

Als wichtigstes Stoffwechselorgan erfüllt die Leber zahlreiche Aufgaben im Intermediärstoffwechsel aller Makronährstoffe (4). So hält sie einen konstanten Blutglukosespiegel aufrecht, indem sie überschüssige Glukose als Glykogen speichert. Aus diesem Notfalldepot und durch Gluconeogenese kann zwischen den Mahlzeiten bei Bedarf rasch Glukose ins Blut abgegeben werden (3, 4). Die Leber verwertet außerdem die Triglyceride aus der Nahrung oder synthetisiert sie aus Fettsäuren und gibt diese anschließend in Form von Very-Low-Density-Lipoprotein (VLDL)-Triglyceriden an die Peripherie ab. Übersteigt die Triglyceridproduktion der Leber die Kapazität der VLDL-Produktion, werden Triglyceride in den Hepatozyten eingelagert und eine Fettleber kann entstehen (4). Weiterhin synthetisiert die Leber Cholesterin und baut Überschüsse beider Gruppen ab (1). Der aus dem bakteriellen Stoffwechsel und Aminosäurestoffwechsel entstehende Ammoniak wird im Harnstoffzyklus fixiert und so entgiftet und zahlreiche Plasmaproteine werden von der Leber produziert. So synthetisiert sie Albumin, ein universales Transportprotein und das wichtigste Serumprotein zur Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks. Außerdem synthetisiert sie weitere

Transportproteine, Protease-Inhibitoren sowie zahlreiche Komponenten des Blutgerinnungs- und des Komplementsystems (3, 4).

Die Leber ist zudem das wichtigste Entgiftungsorgan des Körpers (1). Viele Fremdstoffe, aber auch körpereigene Stoffe, wie Steroidhormone, Schilddrüsen- und Pankreashormone, werden in der Leber einer Biotransformation unterzogen. Diese besteht aus mehreren enzymatisch katalysierten Reaktionen, die die Funktion haben, ihre Substrate in besser ausscheidbare, meist wasserlösliche Formen umzuwandeln (3, 4).

Zuletzt ist die Leber als exokrine Drüse tätig, indem sie Galle bildet, die sich hauptsächlich aus von ihr synthetisierten Gallensäuren, Phospholipiden, Cholesterin und Bilirubin-Diglucuroniden zusammensetzt. Gallensäuren und Phospholipide sind als Detergenzien wichtig für die Fettverdauung, zudem halten Phospholipide als amphiphile Verbindungen das Cholesterin der Galle in Lösung. Bilirubin wird als Abbauprodukt des Häms in der Leber konjugiert und so für die Ausscheidung wasserlöslich gemacht. Es ist als Gallefarbstoff für die charakteristische gelbe Färbung der Galle verantwortlich (3, 4).

1.2. Gallebildung und –sekretion

Pro Tag werden von der Leber circa 600 ml Primärgalle produziert, auch Lebergalle genannt. Diese setzt sich zusammen aus 75 Millimolar (mM) Gallensäuren, 25mM Phospholipiden, 10mM Cholesterin, 5mM Bilirubin-Diglucuroniden und anderen Produkten der Biotransformation. Durch Rückresorption von Natriumchlorid und darauffolgenden Entzug von Wasser wird die Galle in der Gallenblase auf $\frac{1}{5}$ bis $\frac{1}{10}$ ihres Volumens eingedickt, woraufhin sie auch Blasengalle genannt wird (3).

1.2.1. Gallensäurebildung

Gallensäuren werden aus Sterol-Vorstufen gebildet (4). Verschiedene Hydroxylasen wandeln Cholesterol auf dem klassischen Weg zu Cholsäure oder auf dem alternativen Weg zu Chenodesoxycholsäure um, wobei beim Menschen der klassische Weg dominiert (5). Das erste geschwindigkeitsbestimmende Enzym des klassischen Weges ist die Cholesterol-7 α -Hydroxylase (Cytochrom-P450-Enzym 7A1 = CYP7A1) (6). Es folgt eine komplexe Abfolge aus 16 verschiedenen Reaktionen, unter anderem Hydroxylierungen am C12 und C27 durch die Enzyme CYP8B1 und CYP27A1, an deren Ende durch eine Konjugationsreaktion mit

H₂O oder den Aminosäuren Glycin oder Taurin je nach Reaktion Cholsäure oder die konjugierten Gallensäuren Glyko- oder Taurocholsäure entstehen (4, 5, 6).

1.2.2. Bilirubinstoffwechsel

Bilirubin entsteht als Abbauprodukt Häm-haltiger Proteine wie dem Hämoglobin der Erythrozyten. Diese leben im Durchschnitt 120 Tage, bevor sie in Milz, Leber und Knochenmark durch Makrophagen abgebaut werden (3). Täglich entstehen circa 250mg Häm-Gruppen, die nicht weiter verwertet werden können (3, 4). Sie werden durch die Hämoxygenase zu Biliverdin abgebaut, aus welchem durch Reduktion Bilirubin entsteht. Bilirubin, das durch seine hydrophoben Gruppen an der Außenseite wasserunlöslich ist, wird an Albumin gebunden zur Leber transportiert. Dieses an Albumin gebundene Bilirubin wird auch indirektes Bilirubin genannt (3). Über Transporter für organische Anionen (OATPs) wird Bilirubin in die Hepatozyten aufgenommen und dort durch die Uridindiphosphat (UDP)-Glucuronyltransferase (UGT) zu Bilirubinmono- oder -diglucuronid konjugiert. Das konjugierte Bilirubindiglucuronid wird auch als direktes oder konjugiertes Bilirubin bezeichnet und durch aktiven Transport über den Multidrug-Resistance-Related-Protein 2 (MRP2)-Transporter in die Galle und in geringerem Umfang über MRP3-Transporter ins Blut sezerniert und renal eliminiert (4). Unter physiologischen Bedingungen liegt die Bilirubinkonzentration im Plasma unter 1mg/dl. Ab einer Plasmakonzentration von > 2mg/dl diffundiert Bilirubin ins Interstitium, wo es sich ablagert und die charakteristische gelbe Färbung von Haut und Skleren verursacht (Ikterus). Im Kolon wird das konjugierte Bilirubin durch bakterielle Enzyme deglucuronisiert und in mehreren Reduktionen schließlich zu Stercobilin und Urobilin abgebaut, die für die charakteristische dunkle Farbe des Stuhls verantwortlich sind (3).

1.2.3. Exportsysteme in Hepatozyten und Cholangiozyten

Abbildung 1 gibt einen Überblick über die Transportsysteme in Hepato-, Cholangio- und Enterozyten. Gallensäuren werden, konjugiert an Glycin oder Taurin, über Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige Exportpumpen an der apikalen Membran der Hepatozyten ausgeschieden. Wichtige Transportsysteme sind hierbei der Bile-Salt-Export-Pump (BSEP)-Transporter, der zur Familie der ATP-Binding-Cassette (ABC)-Transporter gehört und eine hohe Affinität für konjugierte Gallensalze besitzt und der MRP2-Transporter. Dieser befördert sowohl glucuronidierte und sulfatierte Gallensäuren als auch organische Anionen wie konjugiertes Bilirubin in die Kanalikuli. Außerdem vermittelt er den Export

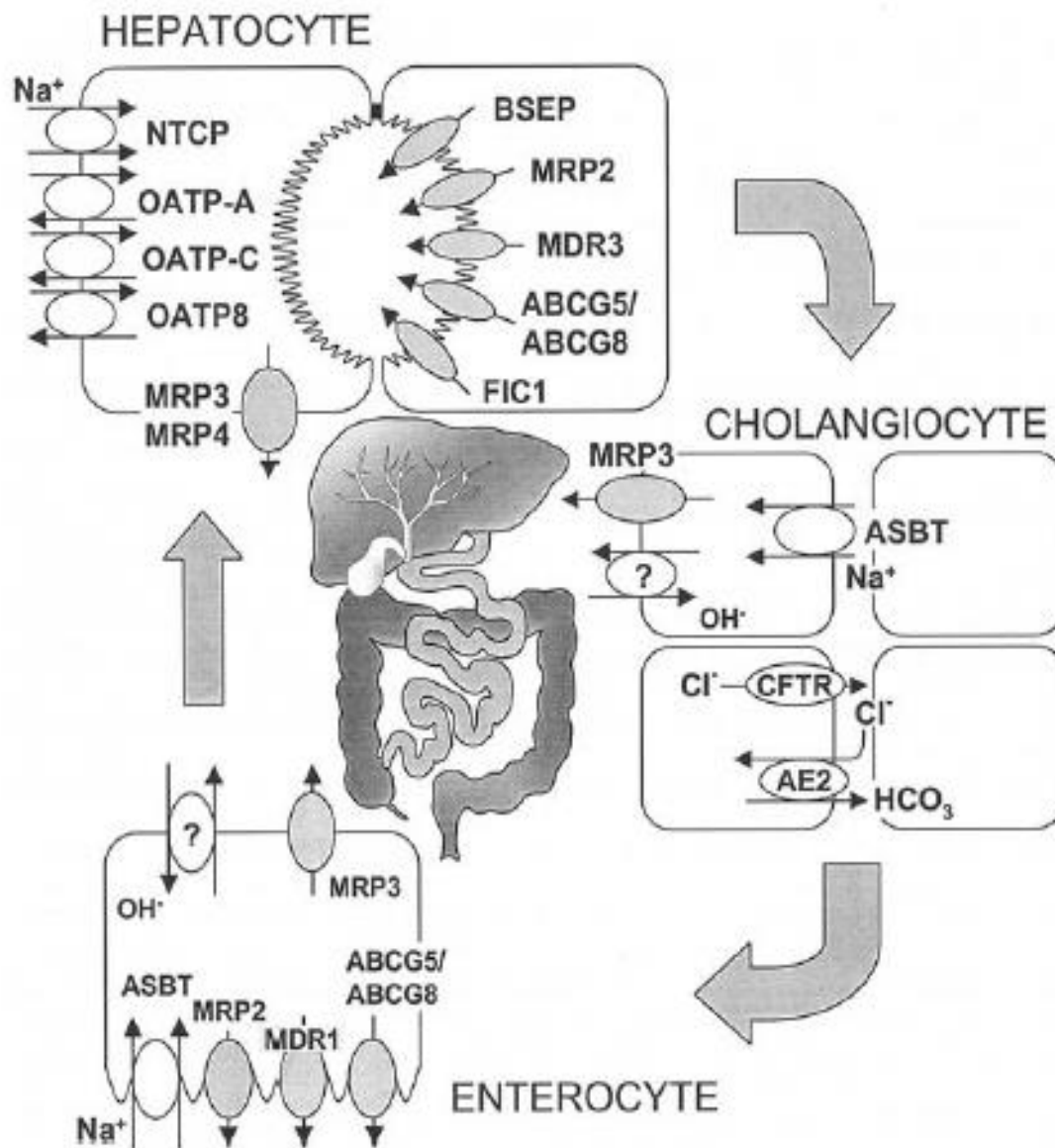


Abb. 1: Transportsysteme in Hepato-, Cholangio- und Enterozyten des Menschen

NTCP = Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide, OATP = Organic-Anion-Transporting-Polypeptide, MRP = Multidrug-Resistance-Related-Protein, BSEP = Bile-Salt-Export-Pump, MDR = Multiple-Drug-Resistance-Protein, FIC1 = Familial-Intrahepatic-Cholestasis-Protein 1, CFTR = Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator. (5)

vieler Medikamente, Toxine und Schwermetalle (5, 7). Phospholipide, vor allem Phosphatidylcholin, werden durch die ATP-abhängige Flippase Multiple-Drug-Resistance-Protein 3 (MDR3) auf die Außenseite der kanalikulären Membran transloziert. Dort bilden sie mit Gallensäuren und Cholesterol Lipidmizellen und schützen die Gallengänge so vor Schäden durch nicht in Mizellen gebundene Gallensäuren (6, 7, 8). In der kanalikulären Hepatozytenmembran befindet sich außerdem das Familial-Intrahepatic-Cholestasis-Protein 1 (FIC1)-Genprodukt, eine ATPase, die vermutlich eine Rolle im Gallensäure- und

Phospholipidtransport spielt, sowie der MDR1-Transporter. Dieser gehört zur Familie der P-Glykoproteine und sorgt sowohl in den Hepatozyten als auch in der Oberfläche von Enterozyten für den Export zytotoxischer Kationen wie Digoxin oder Cyclosporin in die Gallekanalikuli sowie ins Darmlumen (5, 7, 9). An der basolateralen Membran der Hepatozyten sorgt der Transporter MRP3 für den Efflux organischer Anionen wie Bilirubindiglucuronid, während der MRP4-Transporter und der Organic-Solute-Transporter α/β (OST α/β) vor allem konjugierte Gallensäuren retrograd ins Blut der Sinusoide sezernieren (5, 8). MRP3, MRP4 und OST α/β sind unter Normalbedingungen nur schwach exprimiert und stellen bei Cholestase einen alternativen Sekretionsweg bereits wasserlöslicher Komponenten zurück ins Blut dar, woraus diese dann renal eliminiert werden können (6). Über den Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator (CFTR)-Transporter in der apikalen Cholangiozytenmembran wird Chlorid dem elektrochemischen Gradienten folgend in die Kanalikuli abgegeben und schließlich im Antiport gegen Bicarbonat ausgetauscht. Natrium und Wasser folgen den Anionen (Gallensäuren und Bicarbonat) passiv nach, wodurch das Sekret aus den Kanalikuli ausgetrieben wird (4, 7).

1.2.4. Enterohepatischer Kreislauf

Gallensäuren haben eine Schlüsselfunktion im Signalmechanismus des enterohepatischen Kreislaufs. Durch ausgeprägte Feedback-Autoregulation, die die Effektivität des Kreislaufs zwischen Leber und Darm gewährleistet, gehen täglich nur circa 0,5g Gallensäuren über den Stuhl verloren, was über Neusynthese in der Leber kompensiert wird (5). Die Gallensäuren halten Cholesterol in der Galle in Lösung und bilden im Darm gemischte Mizellen im Rahmen der Fettresorption (4, 5). Im distalen Dünndarm und in den Cholangiozyten werden konjugierte und unkonjugierte Gallensäuren über den Apical-Sodium-dependent-Bile-Acid-Transporter (ASBT) in die Enterozyten aufgenommen (5). Ein Großteil gelangt daraufhin auf der basolateralen Seite entweder passiv über die Anionenaustauschsysteme OST α/β in die V. portae oder über den MRP3-Transporter, der sowohl Gallensäuren als auch Bilirubin-Glucuronide aus den Enterozyten und Cholangiozyten ins Pfortaderblut abgibt (4, 5). Gallensäuren werden im Blut an Albumin und Lipoproteine gebunden transportiert und an der basolateralen Hepatozytenmembran über den Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide (NTCP)-Transporter oder über verschiedene OATPs aufgenommen (5). Der NTCP stellt im Hepatozyten den wichtigsten Gallensäureaufnahmemechanismus dar, da mehr als 80% der hepatischen Aufnahme konjugierter Gallensäuren über ihn erfolgt (4, 7). Unkonjugierte Gallensäuren und Bilirubin werden über Transporter für organische Anionen

(OATPs) aufgenommen (8). Menschliche Hepatozyten exprimieren hauptsächlich OATP2 (5, 6). Durch die Regulation all dieser Transportsysteme wird ein Gallensäurepool von 3-5g im Körper aufrechterhalten. Unterbrechungen des enterohepatischen Kreislaufs, z.B. durch Funktionsstörung des Ileums, resultieren in Störungen der Fettresorption und in Fettstühlen (4).

1.2.5. Biotransformation in der Leber

Die Leber ist als wichtigstes Entgiftungsorgan Ort der Biotransformation. Sowohl lipophile, reaktionsträge Verbindungen, die im Körper gebildet wurden, z.B. Steroidhormone, als auch viele Fremdstoffe (Xenobiotika) können in ihrer Form nur schlecht oder gar nicht ausgeschieden werden. Die Aufgabe der Leber ist es deshalb, diese in besser ausscheidbare, wasserlösliche Formen zu überführen, was auch Biotransformation genannt wird (1, 4). Diese besteht aus mehreren enzymatisch katalysierten Reaktionen, die die Sekretion der Stoffe ermöglichen sollen (3). In der Phase I der Biotransformation werden durch Oxidationen, Reduktionen und Hydrolysen reaktive Gruppen in die abzubauenen Stoffe eingefügt. Der erste Schritt ist hierbei meist die Oxidation durch Monooxygenasen der CYP450-Familie, deren häufigster Vertreter CYP3A4 ist. Es wird vermutet, dass 60% aller therapeutisch eingesetzten Wirkstoffe CYP3A4-Substrate sind (3, 4). In den Phase-II-Reaktionen der Biotransformation werden Konjugate zwischen den in der Phase I eingefügten reaktiven Gruppen und hydrophilen Resten hergestellt, sodass Produkte entstehen, die in der Regel wasserlöslicher sind als ihre Ausgangssubstrate. Quantitativ am wichtigsten ist hierbei die Übertragung von Glucuronsäure auf OH-, COOH-, NH₂- und SH-Gruppen durch die UGT. Weitere häufig beteiligte Enzyme der Phase II sind Sulfotransferasen (SULTs) und die Glutathion-S-Transferase, die Sulfatgruppen oder Glutathion übertragen (3, 4). In der Phase III der Biotransformation finden die bereits erwähnten Transportprozesse zur Ausscheidung der gebildeten Konjugate wie des Bilirubindiglucuronids statt (4).

1.2.6. Nukleäre Rezeptoren

Die Gallensäure-Transportsysteme unterliegen einer strengen Regulation, vor allem auf Ebene der Gentranskription (5). So wirken Gallensäuren und auch Xenobiotika bei intrazellulärer Akkumulation als Liganden für nukleäre Rezeptoren (NR). Diese Liganden-regulierten Transkriptionsfaktoren binden im Folgenden an Promotoren der unterschiedlichen Gene des Gallensäuresynthese- und -transportsystems und des Fremdstoffmetabolismus und beeinflussen so deren Transkription (4, 7). Der Farnesoid-X-Rezeptor (FXR) ist vor allem in

der Leber und im Darm vorhanden und wird durch Gallensäuren und nur schwach durch Ursodeoxycholsäure (UDCA) induziert (5, 6, 7). In Folge dessen wird der Gallefluss durch Induktion der Transportsysteme BSEP, MRP2, MDR3 und OST α/β stimuliert und die Detoxifikation durch CYP3A4, UGT2B7 und SULT2A1 gefördert. FXR induziert jedoch auch den nukleären Rezeptor Small-Heterodimer-Partner (SHP), der die Expression von CYP7A1, CYP8B1, NTCP und OATP2, die für Gallensäuresynthese und -aufnahme verantwortlich sind, reduziert (6, 8). Der Pregnane-X-Rezeptor (PXR) hat als Liganden hauptsächlich Xenobiotika, darunter Rifampicin (RMP), Phenobarbital (PB), UDCA und Johanniskraut und aktiviert die Bildung von CYP3A4, OATP2, MDR1 und MRP2, die allesamt für gesteigerte Verstoffwechslung oder Efflux der Xenobiotika verantwortlich sind (9). Auch der Constitutive-Androstane-Rezeptor (CAR) hat wie PXR als Liganden vor allem Xenobiotika wie PB und bewirkt eine gesteigerte Transkription der Exportpumpen MRP3, MRP4 und MRP2 sowie der Detoxifikationsenzyme CYP3A4 und SULT2A1 (6, 8). Bilirubin ist ebenfalls ein CAR-Ligand und bewirkt dessen Translokation in den Nukleus (5, 6).

1.3. Cholestase

Cholestase bezeichnet einen gestörten Abfluss von Galle oder ihrer Bestandteile und somit eine Retention sämtlicher gallepflichtiger Substanzen im Körper (10, 11). Leitsymptome der Cholestase sind Juckreiz und Gelbsucht (Ikterus) (10). Beim Ikterus kommt es in Folge einer erhöhten Bilirubinkonzentration im Blut zu Ablagerungen in Haut und Skleren und so zu deren Gelbfärbung, während Juckreiz (Pruritus) vermutlich durch eine Einlagerung von Gallensäuren in die Haut und eine daraus resultierende Irritation peripherer Nervenendigungen entsteht (11, 12).

Cholestase kann eine Folge gestörter intrahepatischer Galleproduktion, gestörten transmembranären Galletransports oder mechanischer Gangobstruktion sein (13). Hyperbilirubinämie und Ikterus können jedoch auch prähepatisch durch gesteigerte Hämolyse und somit durch erhöhtes indirektes Bilirubin verursacht sein, wie dies beim Neugeborenenikterus der Fall ist (3, 11). Hier liegt eine physiologische Erhöhung des unkonjugierten Bilirubins auf bis zu 15 mg/dl durch eine unreife UGT und somit eine harmlose Ursache des Ikterus vor (3). Bei 2,4 - 15% der Neugeborenen kommt ein solcher Ikterus in den ersten zwei Lebenswochen vor und verschwindet meist spontan ohne Intervention (14).

Infolge der Cholestase lagern sich Gallebestandteile in den kleinen Gallengängen und in den Hepatozyten ab und rufen deren Zerstörung sowie eine Regeneratbildung aus Hepatozyten (Zirrhose) oder Gallekapillaren hervor. Die Leberzirrhose zeichnet sich durch knotige Regeneration des zerstörten Leberparenchyms mit bindegewebigem Umbau der Läppchen- und Portalfeldstruktur aus. Im weiteren Verlauf der Erkrankung wird der Durchfluss des Portalvenenblutes durch die Leber behindert, wodurch der Pfortaderdruck steigt (portale Hypertension) und Umgehungskreisläufe gebildet werden (10). Die portale Hypertension ist die Hauptkomplikation der Leberzirrhose und hat als häufigste direkte Folge die Entwicklung gastroösophagealer Varizen und deren Blutung (15). Weitere Folgen der portalen Hypertension sind die Entwicklung von Splenomegalie und Aszites. Im Laufe der zirrhotischen Lebererkrankung kommt es auch zu Leberfunktionsstörungen mit Gerinnungsstörungen, Hypalbuminämie und Ammoniakintoxikationen, die zu einer Enzephalopathie führen können (10). Durch die fehlenden Gallebestandteile im Darm kommt es bei Cholestase außerdem zu acholischen, entfärbten Stühlen, einer Malabsorption von Fetten und fettlöslichen Vitaminen sowie zu Fettstühlen (4, 14).

Die Ursachen von Cholestase in der Kindheit können grob in obstruktive und hepatozelluläre Ursachen eingeteilt werden (2).

1.3.1. Obstruktive Ursachen

Extrahepatische Gallengangatresie

Bei der extrahepatischen Gallengangatresie (Biliäre Atresie = BA) handelt es sich um eine chronisch progrediente Cholangiopathie mit fortschreitender fibröser Obliteration der extra- und später auch der intrahepatischen Gallengänge. Die Ätiologie der Erkrankung ist bisher unbekannt. Vermutet wird ein infektiöses Agens, das, prä- oder postnatal erworben, die fortschreitende Obliteration auslöst (2). Die Schätzungen der Häufigkeit liegen bei 1:6000 - 1:18000 Geburten, wobei die Inzidenz in Afrika und in der Pazifikregion am höchsten ist und Frauen etwas häufiger betroffen sind als Männer (14, 16). Die BA ist die häufigste Indikation für eine pädiatrische Lebertransplantation weltweit (16). Sie präsentiert sich mit persistierendem oder nach freiem Intervall in den ersten Lebenswochen erneut auftretendem Ikterus, acholischen Stühlen, dunklem Urin und Hepatomegalie (2, 16). Nach anfangs guter Entwicklung kommt es plötzlich zu Gewichtsverlust (16). Über ein Cholestasesyndrom führt die Erkrankung zur progressiven Leberzirrhose mit starkem Juckreiz, Gerinnungsstörungen und Mangel an fettlöslichen Vitaminen. Ohne Intervention stirbt die Mehrzahl der Patienten

in den ersten drei Lebensjahren (2). Die Diagnose sollte optimalerweise bis zu einem Alter von 30 Tagen durch eine verkleinerte oder fehlende Gallenblase in der Sonographie, durch den Nachweis fehlenden Galleflusses in der Szintigraphie oder durch Cholangiographie gestellt werden, um eine palliative Portoenterostomie nach Kasai noch vor dem zweiten Lebensmonat zu ermöglichen. Durch diese Operation kann häufig ein verbesserter Gallefluss sowie ein Rückgang der Cholestasesymptome erzielt werden (2, 16, 17). Eine frühe Diagnosestellung ist sehr wichtig, da die Erfolgsrate stark mit dem Alter bei Eingriff assoziiert ist (13). Durch die Operation wird die Lebenserwartung verbessert, langfristiges Überleben ist jedoch in den meisten Fällen nur mit Lebertransplantation möglich (2).

Caroli-Syndrom

Choledochuszysten sind angeborene oder erworbene sackförmige Erweiterungen des Gallengangsystems unklarer Ursache. Sie sind selten und treten meist ohne andere Fehlbildungen auf. Eine Sonderform dieser obstruktiven Fehlbildung stellt das Caroli-Syndrom (CS) dar (2). Dieses ist charakterisiert durch multiple segmentale zystische Erweiterungen der intrahepatischen Gallengänge, assoziiert mit kongenitaler Leberfibrose. Ursache ist eine Entwicklungsanomalie der Gallengänge durch eine autosomal-rezessive Vererbung von Mutationen im PKHD1-Gen, das auch eine Rolle bei polyzystischer Nierenerkrankung spielt (18). Die Klinik setzt sich zusammen aus portaler Hypertension mit Ösophagusvarizen aufgrund der kongenitalen Leberfibrose und aus Cholestase mit rekurrenter Cholangitis, Gallensteinen und Ikterus, die das klinische Bild dominiert. Diagnostisch ist der Beweis der Kommunikation von Sacculi und Gallengängen durch Sonographie, Computertomographie, MRCP oder ERCP (Magnetresonananz-/ Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie) wichtig, während häufig auch ein Tumor getastet werden kann (2, 18). Therapeutisch werden die veränderten extrahepatischen Gallengänge mitsamt Gallenblase komplett entfernt und eine Anastomose zum Dünndarm gebildet. Verbleibende dysplastische Anteile erhöhen das Risiko der Entstehung eines Cholangiokarzinoms (2). Aussagen über die Prognose und den weiteren Verlauf der Erkrankung können aufgrund mangelnder Daten über das Krankheitsbild nicht getroffen werden (17).

Alagille-Syndrom

Beim Alagille-Syndrom (ALGS) handelt es sich um eine syndromale Gallengangshypoplasie mit einem Mangel an intralobulären Gallengängen (2, 10, 14). Sie tritt bei einem von circa 70.000 Lebendgeborenen auf und wird autosomal-dominant durch eine Mutation im Jagged-1-Gen vererbt. Klinisch sieht man eine chronische Cholestase mit schwerem Pruritus, die

typische dysmorphe Gesichtsform sowie weitere häufige syndromale Fehlbildungen wie z.B. Pulmonalarterienstenosen, Schmetterlingswirbel und okuläres Embryotoxon (2, 14). Die Therapie erfolgt meist symptomatisch durch UDCA und durch Behandlung des schweren Juckreizes mit Antipruritusmedikamenten wie Opioidantagonisten, PB, RMP oder Cholestyramin (10). Das Outcome hängt stark von der individuellen Klinik ab (14). Nur in Einzelfällen wird eine Lebertransplantation erforderlich (2).

1.3.2. Hepatozelluläre Ursachen

Progressive familiäre intrahepatische Cholestasen

Bei den progressiven familiären intrahepatischen Cholestasen (PFICs) handelt es sich um drei verschiedene, autosomal-rezessiv vererbte Störungen verschiedener Gene, die für die Gallebildung verantwortlich sind (14). Bei der PFIC1, auch Byler's Disease genannt, liegt eine Mutation von FIC1 vor, das für den Transport von Phospholipiden verantwortlich ist. Es kommt zu schweren, wässrigen Diarrhöen und Cholestase (5, 14). Bei PFIC2, dem Byler's Syndrome, ist die Ursache eine Mutation des BSEP, die zu einer Akkumulation von Gallensäuren in den Hepatozyten führt (5). Sowohl bei PFIC1 als auch bei PFIC2 entwickelt sich eine Cholestase noch vor dem ersten Lebensjahr bei hohen Serumkonzentrationen von Gallensäuren und normalen Gamma-Glutamyl-Transferase (γ GT)- und Cholesterolverwerten. Viele sprechen auf eine partielle biliäre Diversion oder eine ileale Exklusion an, während die anderen meist vor dem 10. Lebensjahr eine Lebertransplantation erhalten (14). Die Prognose von M. Byler ist ohne Transplantation meist infaust (10). Bei der PFIC3 liegt eine homozygote Mutation im MDR3-Gen vor, einer Phospholipid-Exportpumpe, in deren Folge es aufgrund der fehlenden Phospholipide zu einer toxischen Schädigung des Gallengang-epithels kommt (5). Hier liegen klinisch hohe γ GT-Werte und Entzündungsinfiltrate vor, die schon frühzeitig zu biliärer Zirrhose führen (5, 14). Der Juckreiz ist bei PFIC3 oft milder und spricht auf UDCA an (14). Die Mutationen der jeweiligen PFIC-Gruppen können mit molekulargenetischen Tests nachgewiesen werden (13).

Cystische Fibrose

Die Cystische Fibrose (CF) ist der häufigste genetische Defekt in der kaukasischen Bevölkerung (19). Ursächlich für diese Stoffwechselkrankheit ist eine Mutation im CFTR-Gen auf Chromosom 7, die autosomal-rezessiv vererbt wird (10, 19, 20, 21). Das Genprodukt ist ein Chloridkanal in der apikalen Membran vieler Epithelzellen, darunter Zellen der Lunge und des Pankreas sowie Cholangiozyten der Leber, weshalb die CF eine Systemkrankheit

darstellt (19, 21). Morbidität und Mortalität werden zwar durch den Grad der Beteiligung des respiratorischen Systems bestimmt, trotzdem zählt die Cystic Fibrosis-associated Liver Disease (CFLD), die etwa 30% der CF-Patienten betrifft, als dritthäufigste Todesursache bei CF. Es sind mehr als 1900 unterschiedliche Mutationen im CFTR-Gen bekannt, die häufigste Mutation ist jedoch eine Deletion von Phenylalanin an Position 508, die in Europa und Nordamerika bei 60-70% der Patienten vorliegt und in einem funktionsbeeinträchtigten CFTR-Kanal resultiert (20, 21). Durch den Austausch von Chlorid und Bicarbonat nimmt der CFTR-Kanal eine entscheidende Funktion in der Regulation des Wasser- und Elektrolytgehalts der Galle sowie in deren Alkalisierung ein und sorgt so für den Gallefluss (4, 7, 21). Liegt ein abnormes CFTR-Protein vor, resultiert ein Stau verdickter, visköser Galle, die weniger alkalisch ist und das Lumen der Gallekanäle verlegt. Es kommt zu einer intrahepatischen Gallengangsobstruktion und in deren Folge durch toxische Komponenten zur Schädigung der Hepatozyten mit Entwicklung einer langsam progredienten Leberzirrhose mit portaler Hypertension. Die Leberdysfunktion zeigt sich klinisch meist in den Jahren vor dem Teenageralter mit Bauchschmerzen, Übelkeit, Müdigkeit, Ikterus und Juckreiz (19, 21). Therapeutisch werden fettlösliche Vitamine substituiert und UDCA für alle CF-Patienten empfohlen, da diese einen positiven Effekt auf Galledrainage und Histologie der Leber haben soll (21). Bei stabiler Leberfunktion kann das portale Gefäßsystem durch einen operativen Shunt entlastet werden, während bei fortgeschrittenen Stadien eine Lebertransplantation das Leben verlängern und die Lebensqualität verbessern kann (19, 21).

1.3.3. Pruritus als Symptom der Cholestase

Wie zu Beginn des Kap. 1.3. bereits erwähnt, stellt Pruritus eines der Leitsymptome der Cholestase dar (10). Die Entstehung des Juckreizes bei cholestatischen Erkrankungen ist noch nicht ausreichend geklärt, wobei jedoch eine Stimulation peripherer Nervenfasern der Haut durch ein enterohepatisch zirkulierendes Pruritogen wie beispielsweise Gallensäuren angenommen wird. Gestützt wird diese Hypothese dadurch, dass das Anionenaustauscherharz Cholestyramin, das den enterohepatischen Kreislauf der Gallensäuren durch vermehrte Bindung im Darm unterbricht, bei vielen cholestatischen Patienten eine deutliche Minderung des Juckreizes bewirkt (22). Eines der gängigsten Antipruritus-Medikamente bei Cholestase ist UDCA. Als hydrophile, nicht-toxische Gallensäure ersetzt sie bei oraler Gabe den Pool an hydrophoben, toxischen Gallensäuren (23). Zudem induziert UDCA, wie in Kap. 1.2.6. erklärt, den nukleären Rezeptor FXR und sorgt so durch Reduktion der Aufnahme- und Synthesemechanismen und durch Aktivierung apikaler und basolateraler

Sekretionsmechanismen für einen Schutz der Hepatozyten (6, 8, 24). Auch dem Antibiotikum RMP wird ein antipruritogener Effekt nachgesagt. Durch Induktion von PXR werden, wie in Kap. 1.2.6. dargestellt, viele metabolisierende Enzyme und Transporter wie CYP3A4 und UGT aktiviert und so die Verstoffwechslung cholestatischer Pruritogene wie Gallensäuren und Bilirubin gefördert (23, 25). PB ist ein vor allem bei Kindern genutztes Medikament zur Antipruritusbehandlung (25). Als CAR-Ligand sorgt auch PB durch die Aktivierung verschiedener Detoxifikations- und Sekretionsmechanismen für die Sekretion der Pruritogene Bilirubin und Gallensäuren (6, 8, 25).

1.4. Aktueller Stand der Forschung

Wie in den Kap. 1.2.2., 1.2.3. und 1.2.4. dargestellt, ist bereits sehr viel über die genaue Lokalisation und Funktionsweise sowie die Substrate der hepatobiliären Transportsysteme bekannt. Durch die Fertigstellung des Humangenomprojektes wurde es möglich, diese Transporter zu klonen und es wurde festgestellt, dass bei einigen familiären, cholestatischen Störungen eine Mutation in einem bestimmten Gen, welches für einen solchen Transporter codiert, ursächlich ist, wie beispielsweise bei der PFIC oder bei der CF (8, 21, 26). Zahlreiche Autoren, darunter Kullak-Ublick et al., Zollner et al. sowie Boyer beschäftigten sich außerdem, wie im Kap. 1.2.6. erläutert, bereits mit der Regulation der Genexpression durch die nukleären Rezeptoren FXR, SHP, PXR und CAR. Sie zeigten, dass verschiedene Liganden, darunter Gallensäuren, ihren eigenen Metabolismus durch nukleäre Rezeptoren steuern und dass auch viele bereits genutzte Medikamente wie UDCA, PB und RMP modulierend auf nukleäre Rezeptoren Einfluss nehmen können (5, 6, 7, 8, 9, 27). Wie von Boyer und Zollner et al. zusammengefasst, wurde gezeigt, dass bei Cholestase über diese nukleären Rezeptoren verschiedene adaptive Mechanismen in Gang gesetzt werden, die die Leber vor weiterem Schaden bewahren sollen (6, 8). Es wurde beobachtet, dass Gallensäuresynthese- und -aufnahmesysteme reduziert und Detoxifikations- sowie Effluxmechanismen aktiviert werden (6, 7, 8, 27). Viele dieser Erkenntnisse wurden anhand von Tiermodellen der Cholestase, vor allem bei Ratten, gewonnen, bei denen durch Gallengangsligatur eine künstliche Cholestase induziert wurde (8, 26, 27, 28). Zollner et al. untersuchten jeweils die adaptiven Mechanismen einer Auswahl an hepatobiliären Transportsystemen bei cholestatischen Erkrankungen bei Erwachsenen wie der Primären Biliären Zirrhose/ Cholangitis (PBC), der entzündungsinduzierten Cholestase und der

chronischen Hepatitis C im Vergleich zu Kontrollproben (29, 30). Keitel et al. erforschten die Genexpressionsunterschiede mehrerer hepatobiliärer Transporter bei zehn Kindern mit PFIC2 oder PFIC3, während Chen et al. die Expression einer großen Auswahl an Transportern im Lebergewebe von jeweils acht Kindern mit frühem und spätem Stadium einer BA betrachteten (31, 32). Als frühes Stadium galt bei Letzteren Gewebe, das während der Kasai-OP entnommen wurde, als spätes Stadium galt Lebergewebe, das bei Lebertransplantation gewonnen wurde. Bei beiden Studien wurde nicht-cholestatisches Lebergewebe als Kontrollgewebe verwendet (31, 32). Da Ergebnisse aus Tierstudien nur unzureichend auf den Menschen übertragen werden können und die meisten Genexpressionsuntersuchungen der hepatobiliären Transporter bei cholestatischen Erkrankungen des Erwachsenen stattfanden, herrscht somit ein Mangel an Arbeiten, die die adaptiven Mechanismen bei Cholestase sowie deren Wechselwirkungen mit dem Organismus in ihrer Gesamtheit gegenüberstellend bei cholestatischen Kinderkrankheiten untersuchen (31). Dies gilt vor allem für seltenere cholestatische Erkrankungen wie die PFIC, das ALGS oder das CS. Auch die häufigste Krankheit der cholestatischen Kinderkrankheiten, die BA, zählt mit einer Häufigkeit von 1:10.000 – 1:19.000 zu den seltenen Krankheiten, was patientenbasierte Forschung und den Erwerb neuer Behandlungsmethoden erschwert (17).

Die Auswirkung etablierter Antipruritus-Medikamente auf die Genexpression hepatobiliärer Proteine war bereits Gegenstand einiger Forschungsarbeiten. Marschall et al. untersuchten die Veränderung der Genexpression mehrerer hepatobiliärer Transport- und Detoxifikationssysteme bei ansonsten gesunden Patienten mit Gallensteinen, die vor der Operation RMP, UDCA oder keine derartigen Medikamente erhielten (33). Hagenbuch et al. werteten die Genexpression einiger Transporter für Gallensäuren und organische Anionen bei Ratten aus, nachdem ihnen für fünf Tage PB oder NaCl intraperitoneal verabreicht wurde (34). Benson et al. inkubierten primäre humane Hepatozyten 24 Stunden mit RMP und maßen die Expression von 410 Transporter-Genen der Leber, während Fickert et al. Mäuse für sieben Tage mit UDCA oder Cholsäure fütterten und anschließend die Expression mehrerer Transportsysteme untersuchten (35, 36). Auch hier gibt es zwar bereits einige Forschungsarbeiten, es herrscht jedoch ebenfalls ein Mangel an Daten zur Auswirkung von Antipruritus-Medikamenten auf die Genexpression bei cholestatischen Kinderkrankheiten.

Um bessere Kenntnisse zu Ätiologie, Pathologie und Behandlung cholestatischer Kinderkrankheiten zu gewinnen, liegt deshalb die Notwendigkeit vor, an weiteren Patienten-

kollektiven die adaptiven Mechanismen bei kindlicher Cholestase sowie die Wirksamkeit von Antipruritus-Medikamenten zu untersuchen.

2. Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit werden die verschiedenen cholestatischen Kinderkrankheiten und nicht-cholestatischen Vergleichsproben hinsichtlich klinischer, laborchemischer und histopathologischer Gesichtspunkte charakterisiert. Es werden mRNA-Expressionsunterschiede der nukleären Rezeptoren und hepatobiliären Transporter untersucht und die adaptiven Mechanismen bei Cholestase sowie deren Wechselwirkungen mit klinischen, histopathologischen und laborchemischen Aspekten bei verschiedenen Krankheitsbildern dargestellt. Weiterhin wird die Auswirkung herkömmlicher Antipruritus-Medikamente auf die Genexpression analysiert. Das Hauptaugenmerk der Arbeit liegt auf den cholestatischen Kinderkrankheiten BA, CF, PFIC sowie dem ALGS und dem CS, jeweils im Vergleich zu nicht-cholestatischen Kontrollproben. Die restlichen cholestatischen Erkrankungen werden als cholestatisches Kollektiv in die Analyse der adaptiven Mechanismen mit einbezogen. Bei den zu untersuchenden Transportsystemen handelt es sich um die Aufnahmetransporter NTCP und OATP2, die kanalikulären Effluxmechanismen MRP2, MDR1, MDR3 und FIC1, den Cholangiozytentransporter CFTR sowie die basolateralen Effluxmechanismen MRP3, MRP4 und OST α/β . Zusätzlich sollen die nukleären Rezeptoren FXR, SHP, PXR und CAR betrachtet werden. Im Einzelnen beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit folgenden Fragestellungen:

- Wie sind die cholestatischen Kinderkrankheiten und Vergleichsproben hinsichtlich klinischer, histologischer und laborchemischer Befunde charakterisiert?
- Wie unterscheidet sich die Expression der hepatobiliären Transporter und nukleären Rezeptoren zwischen verschiedenen cholestatischen Erkrankungen und Vergleichsproben?
- Inwieweit korreliert die mRNA-Expression nukleärer Rezeptoren mit der mRNA-Expression hepatobiliärer Transporter? Gibt es mögliche regulatorische Zusammenhänge?
- Inwieweit korrelieren klinische, histopathologische und laborchemische Parameter mit der mRNA-Expression nukleärer Rezeptoren und hepatobiliärer Transporter?
- Inwieweit beeinflussen Antipruritus-Medikamente die mRNA-Expression hepatobiliärer Transporter und nukleärer Rezeptoren?

3. Material und Methoden

3.1. Kindergewebeproben

Die Lebergewebeproben der Kinder wurden über einen Zeitraum von sieben Jahren, von Januar 2008 bis Dezember 2014, im Rahmen von Leberresektionen und Leberbiopsien (Tab. 1), die im Uniklinikum Regensburg stattfanden, gewonnen. Das Lebergewebe wurde jeweils auf Eis direkt vom Operationssaal in die Pathologie des Uniklinikums gebracht, wo ein kleiner Teil für spätere Untersuchungen abgeschnitten wurde. Diese Proben wurden zur Stabilisierung sofort in RNAlater gegeben, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Von den insgesamt 84 Lebergewebeproben wurden 77 bei Leberresektionen aufgrund verschiedener cholestatischer Erkrankungen gewonnen (Tab. 1). Sieben Proben von Kindern mit Lebererkrankungen nicht-cholestatischer Ursache dienten als Vergleichsproben (VP). Bei drei dieser Vergleichsproben wurde eine Leberresektion bei Hepatoblastom durchgeführt, während die anderen vier Vergleichsproben durch Leberbiopsien bei Morbus Meulengracht, unklarer Transaminasenerhöhung, heterozygotem α 1-Antitrypsinmangel und bei Leberfibrose Grad 1 gewonnen wurden. Bei dem entnommenen Gewebe handelte es sich folglich um, hinsichtlich Cholestase, nicht-pathologisch verändertes Lebergewebe. Die cholestatischen Grunderkrankungen bei Leberresektion waren vielfältig. Bei 56 Kindern wurde eine BA diagnostiziert, bei sieben

Tab. 1: Krankheitsbilder bei cholestatischen Lebergewebeproben und Vergleichsproben

Cholestatische Lebergewebeproben (n = 77)	Vergleichsproben (n = 7)
<ul style="list-style-type: none"> • Extrahepatische Gallengangatresie (n = 56) • Cystische Fibrose (n = 7) • PFIC (n = 4) <ul style="list-style-type: none"> ○ PFIC 1 (n = 1) ○ PFIC 2 (n = 1) ○ PFIC 3 (n = 2) • Alagille-Syndrom (n = 2) • Cholangiodysplasie (n = 2) • Sekundär sklerosierende Cholangitis (n = 2) • Caroli-Syndrom (n = 1) • Kongenitale Leberfibrose (n = 1) • Duktalplattenmalformation (n = 1) • Kurzdarmsyndrom mit TPN (n = 1) 	<ul style="list-style-type: none"> • Hepatoblastom (n = 3) • Morbus Meulengracht* (n = 1) • Unklare Transaminasenerhöhung* (n = 1) • Heterozygoter α1-Antitrypsin-Mangel* (n = 1) • Leberfibrose Grad 1* (n = 1)

* = mittels Leberbiopsie entnommen.

PFIC = Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase, TPN = Totale Parenterale Nutrition/ Ernährung.

Kindern eine CF. Vier Kinder litten unter PFIC (1x Typ1, 1x Typ2, 2x Typ3). Bei jeweils zwei Kindern wurde ein ALGS, eine Cholangiodysplasie oder eine sekundär sklerosierende Cholangitis diagnostiziert. Jeweils ein Kind litt an CS, kongenitaler Leberfibrose, Duktalplattenmalformation oder Kurzdarmsyndrom mit langjähriger totaler parenteraler Ernährung (TPN). Vor Eingriff oder mittels Aufklärungsschreiben im Rahmen des Fragebogens (Anhang A und B) wurden die Eltern/ Angehörigen über eine mögliche Nutzung der Gewebeproben sowie krankheitsrelevanter Daten im Rahmen wissenschaftlicher Forschungsprojekte aufgeklärt und eine Einwilligung diesbezüglich eingeholt.

3.2. Datenerhebung zu den Gewebeproben

3.2.1. Daten aus SAP

Die klinischen Daten zu den vorliegenden Lebergewebeproben wurden mittels des SAP-Programms der Universität Regensburg erhoben und als Tabelle in den Programmen Excel® 2010 und SPSS® Statistics 23 gesammelt. Jedem Kind wurde aus Datenschutzgründen eine Transplantations- oder eine Vergleichsprobennummer zugeordnet. Fehlende Werte oder Informationen wurden bei SPSS als solche gekennzeichnet. Tabelle 2 gibt an, welche Daten zur Charakterisierung der Gewebeproben erfasst wurden.

Zunächst wurde die Krankheitsgeschichte der Kinder, soweit in den Arztbriefen und im Operationsbericht erwähnt, in Form von Geburtsdatum, Geschlecht, Alter bei Symptombeginn und Datum des Eingriffs vermerkt (Tab. 2). Aus dem Geburtsdatum und dem Datum des Eingriffs wurde das Alter bei Eingriff errechnet.

Die klinischen Parameter Aszites und Milzlänge wurden, soweit vorhanden, aus Befunden der Abdomensonographie entnommen. Aus der Milzlänge wurde mithilfe einer Normtabelle (Anhang C) für jedes Kind anhand des Alters bestimmt, ob eine Splenomegalie vorlag. Falls in den Sonographiebefunden keine Angaben zu Milzlänge oder Aszites gemacht wurden, wurde das Vorhandensein von Splenomegalie oder Aszites aus den Arztbriefen entnommen.

Die restlichen Symptome einer Cholestase (Hautikterus, Sklerenikterus, Juckreiz, dunkler Urin, acholischer Stuhl und Ansprechen auf Antipruritus-Medikamente) wurden nicht zuverlässig in den Arztbriefen erwähnt, weshalb diese Daten aus Fragebögen entnommen wurden, die im Rahmen der Datenerhebung an die Familien geschickt wurden (Anhang B).

Tab. 2: Daten zur Charakterisierung der Gewebeproben

Krankheitsgeschichte	
Geburtsdatum, Geschlecht, Alter bei Symptombeginn (Jahre), Datum des Eingriffs, Alter bei Eingriff (Jahre)	
Klinische Daten der Erkrankung	
Aszites (j/ n), Splenomegalie (j/ n), Milzlänge (cm)	
Aus Fragebögen: Haut-/ Sklerenikterus (j/ n), Juckreiz (j/ n), dunkler Urin (j/ n), acholischer Stuhl (j/ n), Ansprechen auf Antipruritusmedikation (j/ n/ kein Juckreiz vorhanden)	
Klinische Chemie	
Cholestaseparameter:	AP (U/l), Bilirubin direkt/ gesamt (mg/dl), Gallensäuren Glyko-/ Tauro-/ gesamt (µmol/l), γGT (U/l)
Leberzellschädigung:	GOT (U/l), GPT (U/l), GLDH (U/l), LDH (U/l)
Entzündungsmarker:	CRP (mg/l)
Synthesefunktion:	CHE (U/l), Gesamteiweiß (g/l), Quick-Wert (%)
Medikamente	
Antipruritus-Medikamente: Ursodeoxycholsäure, Rifampicin, Phenobarbital	
Histopathologische Befunde	
Gewebetyp:	Leberresektion/ Leberbiopsie
Cholestase:	keine/ leicht/ mittel/ schwer
Inflammation:	keine/ leicht/ mittel/ schwer/ vorhanden o. genaue Bezeichnung
Fibrose:	j/ n
Zirrhose:	j/ n
Gallengangsproliferate:	j/ n
j = ja, n = nein, AP = Alkalische Phosphatase, GOT = Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, GPT = Glutamat-Pyruvat-Transaminase, GLDH = Glutamatdehydrogenase, LDH = Laktatdehydrogenase, CRP = C-reaktives Protein, CHE = Cholinesterase.	

Die Angaben zur Medikamenteneinnahme vor Eingriff wurden aus dem Arztbrief entnommen, der am nächsten zum Eingriff datiert war. Es wurde die Einnahme der Antipruritusmedikamente UDCA, PB, RMP sowie deren Kombinationen jeweils mit Dosisangabe notiert.

Die Laborwerte der Kinder wurden, wie in Kap. 3.2.3. beschrieben und in Tab. 2 dargestellt, von der klinischen Chemie angefordert.

Auch die Pathologiebefunde zum entnommenen Lebergewebe wurden konsultiert und die Entnahmeart des Gewebes (Resektion/ Biopsie) sowie typische histologische Gesichtspunkte

einer cholestatischen Erkrankung und deren Ausprägung erfasst. So wurde besonders auf das Vorliegen von Inflammation, Zirrhose, Cholestase und von Gallengangsproliferaten geachtet (Tab. 2).

3.2.2. Fragebogen an die Familien

In den Arztbriefen wurden vor allem die klinischen Parameter und Symptome der cholestatischen Erkrankungen wie Ikterus, Verfärbung von Urin und Stuhl sowie Juckreiz, die die betroffenen Kinder stark quälen, nur unzuverlässig und nicht immer vollständig erwähnt. Auch zum Ansprechen der Kinder auf Antipruritus-Medikamente waren zu wenig sichere Daten in den Arztbriefen vorhanden. All diese Gesichtspunkte spielten jedoch für die Fragestellung dieser Arbeit und auch für das cholestatische Krankheitsbild eine große Rolle. Da niemand die Kinder und ihre Krankheitsgeschichte besser kennt als ihre Eltern, wurde ein spezieller Fragebogen entwickelt, der die oben genannten Daten abfragt (Anhang B). Soweit noch nicht vorhanden, wurde für die entsprechenden Familien außerdem ein Aufklärungsschreiben über die Verwendung der Lebergewebeproben und des von den Kindern gewonnenen Blutes sowie eine Einverständniserklärung über die Nutzung des Gewebes erstellt (Anhang A). Es wurde darauf hingewiesen, dass Kinder ab einem Alter von 14 Jahren, die in der Lage sind, die Informationen zu verstehen und sich selbst ein Urteil zu bilden, eigenständig die Einwilligungserklärung unterschreiben oder ablehnen dürfen. Die Fragebögen wurden anschließend an die Familien der Kinder mit cholestatischer Erkrankung verschickt.

Der Fragebogen fragte ab, ob die Eltern bei ihrem Kind im Zeitraum vor der Lebertransplantation eine Gelbfärbung von Haut und/ oder Augen, eine intensive Gelb- oder Braunfärbung des Urins und/ oder eine Aufhellung (gelbliche Färbung) des Stuhls festgestellt haben. Zur Klärung der Stuhlfarbe wurde dem Fragebogen eine Kuno-Kids-Farbkarte beigelegt, auf der verdächtige Stuhlfarben abgebildet sind (Anhang D). Die Eltern wurden aufgefordert, anzugeben, ob ein verdächtig gefärbter Stuhl bei ihrem Kind aufgetreten ist und falls ja, welche Nummer der Farbkarte zutraf. Weiterhin wurde gefragt, ob bei dem jeweiligen Kind Juckreiz vorhanden war und falls ja, ob dieser auf eine Körperregion beschränkt oder am ganzen Körper präsent war und ob Hautveränderungen wie Ausschlag, Kratzspuren oder aufgekratzte Hautstellen bei den jeweiligen Kindern bemerkt wurden. Zum Schluss wurde die Frage gestellt, ob die Kinder auf das jeweils erhaltene Medikament zur Juckreizbehandlung und -prophylaxe angesprochen haben. Es wurde für jedes Kind ein individueller Brief

gedruckt, sodass jeweils nur die erhaltenen Medikamente abgefragt wurden. Im Anhang A sind Aufklärungsschreiben und Einverständniserklärung abgebildet, während Anhang B den Fragebogen zeigt.

3.2.3. Daten der klinischen Chemie

Die Laborwerte der 84 Kinder wurden von der Klinischen Chemie des Universitätsklinikums Regensburg angefordert und auch hier Befunde festgehalten, die möglichst nah vor erfolgtem Eingriff lagen. Die einzelnen Werte sind in Tab. 2 dargestellt. Ein besonderes Augenmerk wurde, auch im Hinblick auf die Auswertung, auf den Entzündungsmarker C-reaktives Protein (CRP) und die Cholestasemarkers Alkalische Phosphatase (AP), Bilirubin (direkt und gesamt), Gallensäuren (Glyko-, Tauro-, gesamt), sowie γ GT gelegt. Die Transaminasen Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) sowie die Laktatdehydrogenase (LDH) und die Glutamatdehydrogenase (GLDH) wurden als Marker für den Leberzellschaden notiert. Die Parameter Cholinesterase (CHE), Gesamteiweiß und Quick-Wert dienten zur Prüfung der Lebersynthesefunktion.

3.3. RNA-Isolation

Die Isolation der totalen Ribonukleinsäure (RNA) aus den Lebergewebeproben der Kinder erfolgte unter Verwendung des mirVana™ miRNA Isolation Kits und des dazugehörigen mirVana™ miRNA Isolation Kit Protokolls (Ambion®, Life Technologies) (37).

Gemäß des Protokolls wurden vor Beginn der RNA-Isolation die Waschlösungen mit der jeweiligen Menge an 100% Ethanol angemischt und der Arbeitsplatz sowie die verwendete Pinzette mit RNase-Dekontaminationsspray (RNaseZAP™, R2020 SIGMA) gereinigt. Das in RNAlater (RNAlater®, R0901 SIGMA) oder pur eingefrorene Lebergewebe wurde in flüssigem Stickstoff aus dem -80°C-Kühlschrank geholt und in kleinen Waagschälchen (2149.2, Roth) abgewogen.

Das verwendete Gewebe, das meist unter 100mg und nur in vereinzelten Fällen etwas mehr wog, wurde mittels eines Einwegskalpells (Feather, No.22) zerkleinert und zusammen mit 1ml Lysepuffer in M-Tubes (gentleMACS™ Tubes) auf Eis gegeben. Im gentleMACS™ Dissociator (MACS, Miltenyi Biotec) wurde das Gewebe anschließend 60 - 84 Sekunden mit dem Programm RNA02.01 geschreddert, bis es vollständig in Lösung gegangen und keine Gewebeteilchen mehr sichtbar waren. Waren nach einem Durchlauf noch Gewebestückchen

zu sehen, wurde das Programm nach einer Kühlphase auf Eis wiederholt. Das Homogenisat wurde fünf Minuten bei 4°C bei 4,000 x g zentrifugiert.

Zur organischen Extraktion wurde anschließend so viel Lysat wie möglich aus dem Plastiktube in 2ml Tubes überführt und $\frac{1}{10}$ des gewonnenen Volumens an microRNA (miRNA) Homogenate Additive zugegeben. Die Mischung wurde kurz gevortext und zehn Minuten auf Eis gegeben. Es folgte die Zugabe der gleichen Menge Chloroform wie an Lysat vor Zugabe des Homogenate Additive vorhanden war. Es wurde 30 Sekunden gevortext und anschließend bei Raumtemperatur fünf Minuten auf Maximalgeschwindigkeit (10,000 x g) zentrifugiert, um die wässrige von der organischen Phase zu trennen. Nach der Zentrifugation folgten die Entnahme der obersten, wässrigen Phase sowie die Überführung in 1,5ml Tubes. Das entnommene Volumen wurde notiert und zur finalen RNA-Extraktion die 1,25 fache Menge an 100% Ethanol zugegeben und wiederum kurz gevortext. Die gewonnene Ethanol/Lysat-Mischung wurde in 700µl-Schritten auf spezielle Filtereinsätze im Collection Tube gegeben und jeweils für 15 Sekunden bei 10,000 x g zentrifugiert, bis die komplette Mischung durch den Filter gelaufen war. Der Durchlauf wurde jeweils verworfen. Anschließend wurde die im Filter verbliebene RNA einmal mit 700µl RNA Waschlösung 1 und zweimal mit 500µl Waschlösung 2/ 3 gereinigt und jeweils der Durchfluss verworfen. Zum Schluss folgte die erneute Zentrifugation für eine Minute, um die übriggebliebene Flüssigkeit zu entfernen.

Der Filter mit der RNA wurde auf ein frisches Collection Tube aufgebracht und die RNA mit 100µl RNase-freiem Wasser und anschließender 30-sekündiger Zentrifugation eluiert. Der Durchlauf, der nach diesem Schritt die RNA beinhaltete, wurde in ein kleineres Tube überführt und die Konzentration der enthaltenen RNA mittels des NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometers (Thermo Scientific) im RNA-Programm bestimmt. Bei den vier vorhandenen Leberbiopsien war so wenig Gewebe verfügbar, dass am Ende zweimal hintereinander mit 30µl statt 100µl RNase-freiem Wasser eluiert wurde, um die Konzentration der enthaltenen RNA zu erhöhen. Die gewonnenen RNA-Isolationen wurden zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt (37).

3.4. Qualitätskontrolle der totalen RNA

Prinzip

Zur Qualitätsbestimmung der aus den Lebergewebeproben der Kinder gewonnenen RNA wurden der Agilent 2100 Bioanalyzer und der dazugehörige Agilent RNA 6000 Nano Kit verwendet (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Der Agilent 2100 Bioanalyzer bedient sich hierbei der Methode der Gelelektrophorese im Chip-Format. In den RNA Nano Chip sind Mikrokanäle aus Glas eingearbeitet, die die einzelnen Wells miteinander verbinden. Während der Vorbereitung werden die Mikrokanäle mit einem siebenden Polymer (RNA 6000 Nano Gel Matrix) und einem Fluoreszenzfarbstoff (RNA 6000 Nano Dye Concentrate) gefüllt. Zusätzlich wird der Chip mit einem externen Längenstandard (Agilent RNA 6000 Ladder) sowie mit einem Markerfragment (RNA 6000 Nano Marker) beladen. Aus dem befüllten Chip und den Elektroden des Bioanalyzers entsteht ein elektrisches Feld, in dem die negativ geladenen Ribonukleinsäuren zum Pluspol wandern und durch die Gelmatrix nach ihrer Größe getrennt werden. Die Detektion erfolgt durch die Fluoreszenz des zugegebenen Farbstoffs, dessen Moleküle die RNA interkalieren. Die detektierte Fluoreszenz wird in einem Elektropherogramm gegen die Zeit aufgetragen und zusätzlich in ein Bandenmuster verwandelt. Mit Hilfe des zugegebenen Größenstandards, der RNA-Fragmente bekannter Größe enthält und mithilfe des Markerfragments können die Nukleotidgrößen der detektierten Fragmente anhand der Migrationszeit bestimmt und die verschiedenen Proben miteinander verglichen werden (38).

Durchführung

Gemäß dem Protokoll des Herstellers wurden Aliquots an Agilent RNA 6000 Ladder und RNA 6000 Nano Gel-Matrix für den täglichen Bedarf hergestellt. Der RNA-Ladder wurde anschließend bei -80°C, das gefilterte Gel gemeinsam mit den restlichen Reagenzien bei 4°C aufbewahrt. Vor Beladen und Analyse eines RNA Nano Chips wurden die Reagenzien 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Aus den bei -80°C gelagerten RNA-Proben der Kinder wurden jeweils 2µl entnommen, in RNase-freie Tubes pipettiert und kurz zentrifugiert. Die Ladder-Aliquots wurden aufgetaut und mit den 2µl-RNA-Proben der Kinder auf Eis gegeben. Die Chip-Priming-Station, der Agilent 2100 Bioanalyzer mit dazugehöriger Software und der Vortex-Mixer wurden richtig eingestellt und entsprechend vorbereitet.

Um das Gel-Farbstoff-Gemisch herzustellen wurden 0,5µl RNA 600 Nano Dye Concentrate in 32,5µl RNA 6000 Nano Gel-Matrix pipettiert. Das entstandene Farbstoff-Gel-Gemisch wurde kurz gevortext und zehn Minuten bei 13,000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden

6µl RNA 6000 Nano Marker auf 2µl RNA-Ladder pipettiert und gemeinsam mit den 2µl-Kinder-Proben im Thermomixer (Eppendorf ThermoMixer® comfort) bei 70°C denaturiert. Sowohl das Marker-Ladder-Gemisch als auch die Kinder-Proben wurden danach auf Eis gegeben.

Die Beladung des Chips erfolgte nach Herstellerprotokoll in der Chip-Priming-Station: 9µl des Farbstoff-Gel-Gemischs wurden in das Well G pipettiert. Die Station wurde geschlossen und der Chip unter Luftdruck aus der Spritze für 30 Sekunden geladen. Anschließend wurde die Station wieder geöffnet und jeweils 9µl der reinen Gel-Matrix und 8µl Ladder in die dafür vorgesehenen Wells pipettiert. Die zwölf Proben-Wells wurden jeweils mit 7µl Marker sowie mit 1µl der jeweiligen RNA-Probe beladen. Bei unterbelegtem Chip wurden in die Leerpositionen 8µl statt 7µl des Markers pipettiert, um ein optimales Eintauchen der Kapillaren zu garantieren. Der beladene Nano Chip kam anschließend für 60 Sekunden bei 2400 rpm in den Vortexer. Vor der qualitativen RNA-Analyse im Agilent 2100 Bioanalyzer erfolgte eine Reinigung der Elektroden. Hierfür wurde ein Elektroden-Reinigungs-Chip mit 350µl RNaseZAP® (RNaseZAP® Solution, Ambion®, Applied Biosystems) gefüllt und 20 Sekunden in den Agilent 2100 Bioanalyzer gelegt. Die zweite Reinigung erfolgte für zehn Sekunden durch einen mit 350µl RNase-freiem Wasser gefüllten Reinigungs-Chip. Nach der Reinigung der Elektroden wurde der mit den Proben beladene Nano-Chip eingelegt und nach Auswahl des RNA-Assays die Analyse gestartet. Anschließend wurde der Nano Chip umgehend aus dem Bioanalyzer entfernt und die Elektroden erneut, wie oben beschrieben, mit RNaseZAP® und RNase-freiem Wasser gereinigt (39).

Auswertung der Ergebnisse

Das Elektropherogramm trägt im Rahmen einer densitometrischen Analyse die Fluoreszenz einer Probe gegen die Zeit auf (Abb. 2). Der erste Peak im Elektropherogramm sollte dabei dem Marker-Fragment entsprechen, während die beiden großen Peaks die eukaryontischen 18S- und 28S-RNA-Fragmente wiedergeben sollten. Aus der kompletten Bildspur der RNA-Probe wird durch einen Algorithmus der Software der RNA Integrity Number (RIN)-Wert einer Probe bestimmt. Dieser Wert hilft, die Integrität von gesamt-RNA Proben zu schätzen und untereinander zu vergleichen. Ein RIN-Wert von 10 stellt dabei eine perfekte RNA-Probe ohne degradierte Produkte dar, während ein RIN-Wert von 1 für eine vollständig degradierte Probe spricht (38). Die RIN-Werte aller Kindergewebeproben wurden im Agilent 2100 Bioanalyzer gemessen und für die weitere Auswertung notiert. Abbildung 2 zeigt ein gelungenes Elektropherogramm mit einem RIN-Wert von 10.

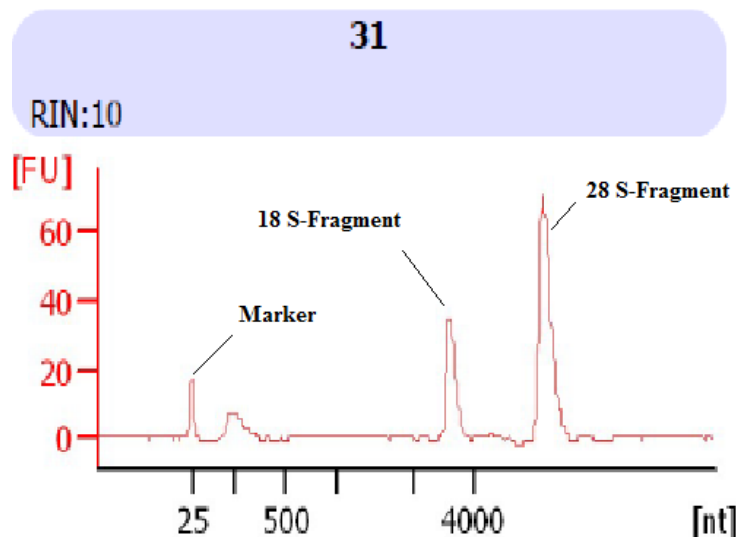


Abb. 2: Beispiel eines Elektropherogramms

RIN = RNA-Integrity-Number, FU = Fluoreszenz, nt = Länge des RNA-Fragments in Nukleotiden.

3.5. Genexpressionsmessung

Pipettieren des Genchips

Die 84 isolierten RNA-Proben wurden zur weiteren Verwendung auf eine Multiwell-Platte (LightCycler® 480 Multiwell Plate 96) pipettiert. Jede RNA-Probe wurde dafür vorher auf eine Konzentration von 50ng/µl verdünnt. Anschließend wurden davon jeweils 12µl in das dafür vorgesehene Well gegeben. Die fertig pipettierte Platte wurde auf Trockeneis gelegt und zusammen mit einer Tabelle, die die Belegung der Platte und die gemessenen RIN-Werte der Proben enthielt, zur Genexpressionsanalyse an das Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie in Stuttgart geschickt.

Synthese von cDNA und qRT-PCR

In Kooperation mit Prof. Dr. Ulrich Zanger (Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut für Klinische Pharmakologie, Universität Tübingen, Stuttgart, Deutschland) wurde mittels der TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) aus 0,5µg totaler RNA complementary-Desoxyribonukleinsäure (cDNA) erstellt. Anschließend wurde nach Anleitung des Herstellers mit dem Fluidigm 96.96 Dynamic-Array™ im Fluidigm BioMark HD (Fluidigm Corporation, San Francisco, CA) eine quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) durchgeführt, um die Expression von zehn verschiedenen hepatobiliären Transportergenen und vier Genen für nukleäre Rezeptoren zu

messen. Zusätzlich wurde die Genexpression der zwei Housekeeping-Gene Hypoxanthin-Guanin- Phosphoribosyltransferase (HPRT) und YWHAZ bestimmt. Bei den 14 erstgenannten Genen handelt es sich um Gene, die für Proteine kodieren, die im Rahmen von Transportvorgängen im hepatobiliären System, bei Detoxifikationsprozessen sowie als nukleäre Rezeptoren in der Leber eine Rolle spielen. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die untersuchten Gene und deren Funktion.

Die entsprechenden TaqMan®-Assays zur Amplifikation der verschiedenen Gene wurden von Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) bezogen (40). Der Fluidigm 96.96. Dynamic Array™ enthält jeweils 96 Wells zum Aufbringen der cDNA-Proben und 96 Wells zum Aufbringen der TaqMan®-Assays (41). Über ein in der Platte integriertes System aus Flusskanälen, Ventilen und Reaktionskammern können unter Druck des Nano Flex™ IFC Controllers die Proben mit den jeweiligen Assays in individuellen Reaktionskammern systematisch zusammengeführt werden (42). Anschließend können parallel 9.216 qRT-PCR-Reaktionen ablaufen. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität ist proportional zur Anzahl der gespaltenen Tester-Moleküle und somit zur Menge der cDNA des spezifischen Gens in der Probe. Eine hochauflösende CCD-Kamera bildet gleichzeitig alle Reaktionen des Dynamic-Arrays ab (41). Nach jedem Zyklus kreiert sie aus den entstandenen Fluoreszenzen ein Bild des Chips, auf dem jedes kleine Quadrat eines der Wells repräsentiert. Verschiedene Farben stehen hierbei für verschiedene Threshold-Cycle (CT)-Werte. Nach Cycling-Abschluss generiert die Software eine PCR-Kurve für jedes dieser Wells (42). Anhand der PCR-Kurve kann für jede Reaktion ein CT-Wert angegeben werden, bei dem die vorgegebene Fluoreszenzintensität erreicht wurde (41). Eine solche PCR-Kurve ist in Abb. 3 zu sehen.

Bestimmung der relativen Genexpression

Um die relativen Unterschiede in der Genexpression bei den verschiedenen Proben zu berechnen, wurde die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode genutzt. Hierbei werden die erhaltenen CT-Werte eines jeden Gens mit den CT-Werten eines konstant exprimierten Gens ins Verhältnis gesetzt, dem sogenannten Housekeeping-Gen. In diesem Fall wurde als Housekeeping-Gen HPRT verwendet. Anschließend wird der erhaltene ΔCT -Wert mit dem ΔCT -Wert der Referenzprobe ins Verhältnis gesetzt, um den $\Delta\Delta CT$ -Wert zu erhalten. Als Referenzprobe wurde eine Vergleichsprobe mit Hepatoblastom gewählt. Aus dem $\Delta\Delta CT$ -Wert wird zum Schluss der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert ermittelt, mit dem anschließend die weitere statistische Auswertung durchgeführt wurde.

Tab. 3: Übersicht über die untersuchten Gene

Hepatobiliäre Transporter	
Basolaterale Aufnahmetransporter	<ul style="list-style-type: none"> • NTCP • OATP2
Kanalikuläre Effluxtransporter	<ul style="list-style-type: none"> • MRP2 • MDR1 • MDR3 • FIC1
Cholangiozytentransporter	<ul style="list-style-type: none"> • CFTR
Basolaterale Effluxtransporter	<ul style="list-style-type: none"> • MRP3 • MRP4 • OSTα/β
Nukleäre Rezeptoren	
	<ul style="list-style-type: none"> • FXR • SHP • PXR • CAR
Housekeeping-Gene	
	<ul style="list-style-type: none"> • HPRT • YWHAZ

NTCP = Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide, OATP = Organic-Anion-Transporting-Polypeptide, MRP = Multidrug-Resistance-Related-Protein, MDR = Multiple-Drug-Resistance-Protein, FIC1 = Familial-Intrahepatic-Cholestasis-Protein 1, CFTR = Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator, OST = Organic-Solute-Transporter, FXR = Farnesoid-X-Rezeptor, SHP = Small-Heterodimer-Partner, PXR = Pregnane-X-Rezeptor, CAR = Constitutive-Androstane-Rezeptor, HPRT = Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase.

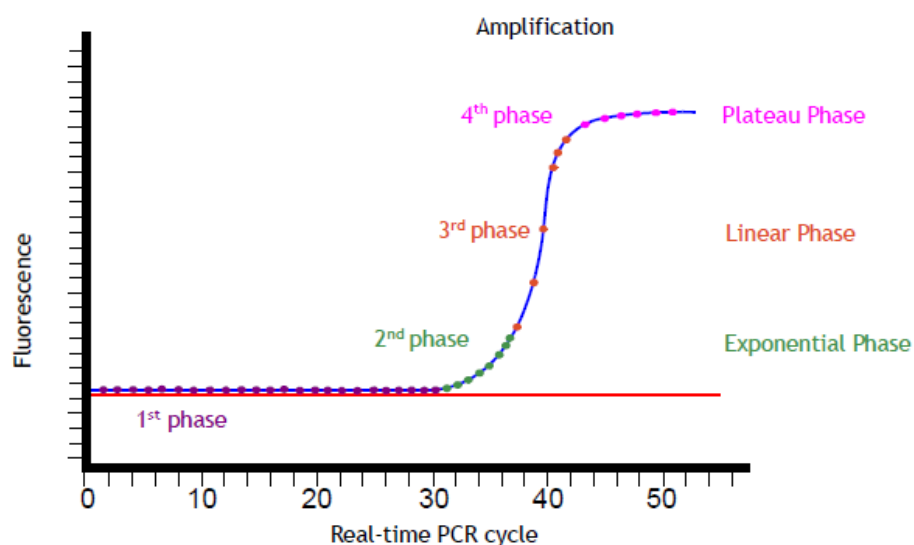


Abb. 3: Charakteristischer Anstieg der Fluoreszenzintensität im Rahmen einer qRT-PCR (41)

3.6. Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Microsoft Excel® 2010, sowie IBM SPSS® Statistics 23.0.

Boxplotdiagramme wurden gewählt, um die Verteilung und Streuung der Werte einer Variablen darzustellen. Abbildung 4 zeigt einen Boxplot, der im Rahmen der statistischen Auswertung dieser Arbeit entstand. Ein dicker schwarzer Balken innerhalb der ausgefüllten Fläche des Boxplots kennzeichnet den Median, die untere bzw. die obere Grenze der ausgefüllten Fläche kennzeichnen das 25%- bzw. 75%-Perzentil. Der Abstand zwischen dem 25% und dem 75%-Perzentil nennt sich Interquartilsabstand. Werte, deren Abstand nach oben vom 75%-Perzentil oder nach unten vom 25%-Perzentil mehr als das 1,5-fache vom Interquartilsabstand beträgt, werden als Ausreißer bezeichnet und durch einen Kreis dargestellt. Ein kleines Viereck kennzeichnet Extremwerte. Bezüglich der restlichen Datenwerte geben die kleineren, waagrechten Linien ober- und unterhalb der ausgefüllten Fläche Maximum und Minimum an (43, 44).

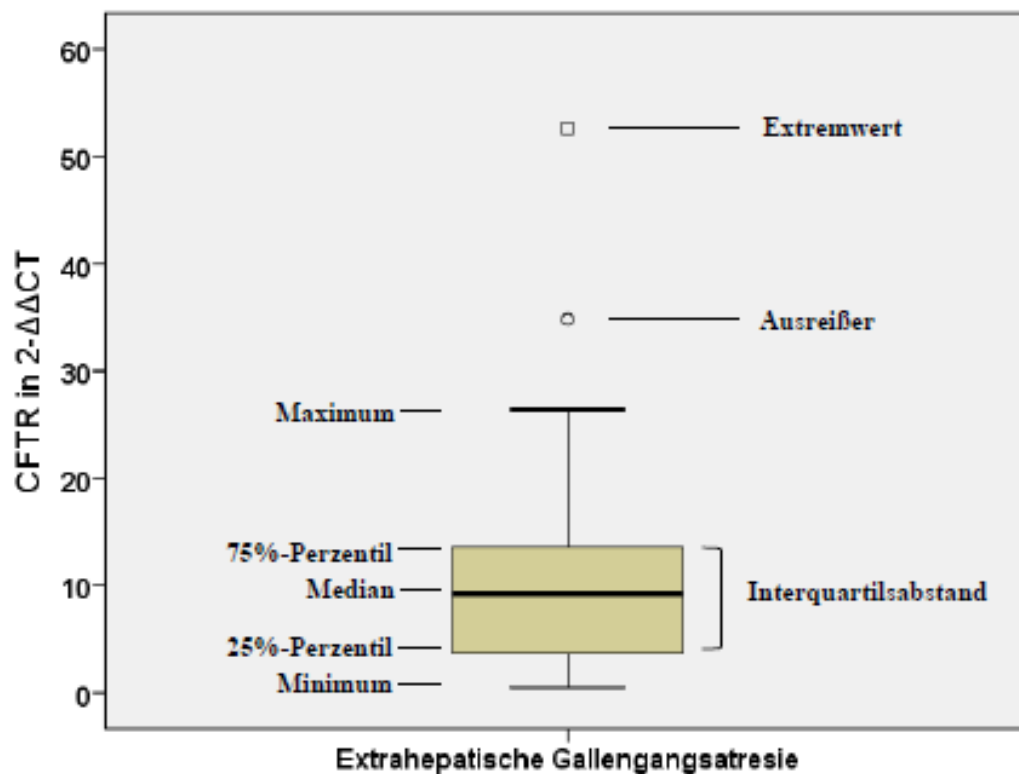


Abb. 4: Beispiel eines Boxplotdiagramms

CFTR = Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator.

Streudiagramme wurden verwendet, um die gemeinsame Verteilung und den Zusammenhang zweier metrisch skalierten Variablen optisch wiederzugeben. Zwei Variablen werden hierfür in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen, sodass jedem Wert der x-Achse ein entsprechender Wert der y-Achse zugeordnet werden kann. Abbildung 5 zeigt ein solches Streudiagramm, das den Ergebnissen dieser Arbeit entstammt. Um einen möglichen, linearen Zusammenhang der beiden Variablen darzustellen, wurde für jedes Diagramm eine Regressionsgerade erstellt und der jeweilige Pearson-Korrelationskoeffizient r berechnet. Bei der Erstellung einer Regressionsgeraden wird den beiden Variablen ein linearer Zusammenhang unterstellt, der in Form einer Geraden durch das Diagramm dargestellt werden kann. Anhand deren Geradengleichung kann man für jeden x-Wert einen y-Wert vorhersagen. Der Pearson-Korrelationskoeffizient misst die relative Stärke eines linearen Zusammenhangs. Die Werte bewegen sich zwischen -1 und +1. Je näher der Wert des Korrelationskoeffizienten an 0 ist, desto schwächer ist die lineare Korrelation, je näher der Wert an -1 oder +1 ist, desto stärker ist sie.

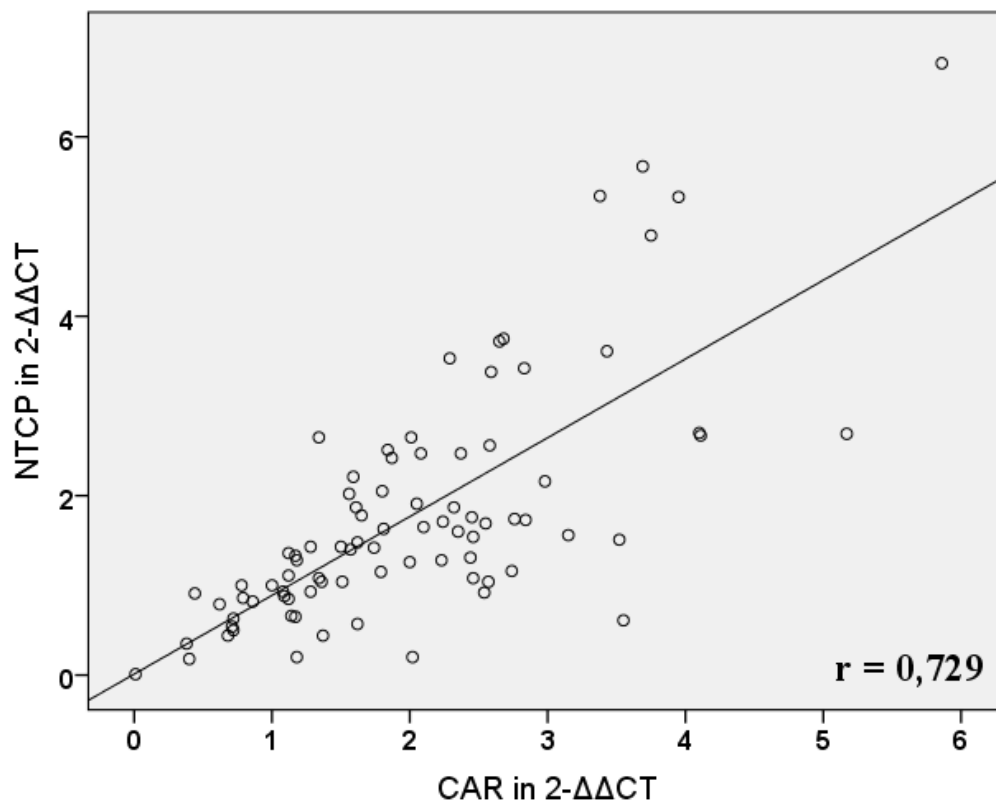


Abb. 5: Beispiel eines Streudiagramms mit einer Regressionsgeraden und dem dazugehörigen Pearson-Korrelationskoeffizient r

NTCP = Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide, CAR = Constitutive-Androstane-Rezeptor.

Eine perfekte positiv-lineare Korrelation liegt dann vor, wenn hohe Werte der einen Variablen mit hohen Werten der anderen einhergehen, einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von +1 und einer Regressionsgeraden was sich in mit der Steigung +1 ausdrückt. Eine perfekte negativ-lineare Korrelation liegt dementsprechend dann vor, wenn hohe Werte der einen Variablen mit niedrigen Werten der anderen auftreten. In diesem Fall betragen die Steigung der Regressionsgerade sowie der Pearson-Korrelationskoeffizient jeweils -1 (43, 44, 45).

Zur Untersuchung, ob sich die Mittelwerte zweier Fallgruppen signifikant voneinander unterscheiden, wurde in dieser Arbeit der Mann-Whitney-U-Test verwendet. In allen Fällen galt bei einem Signifikanzniveau von 95% ein p-Wert $<0,05$ als statistisch signifikant unterschiedlich.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung der Gewebeproben

Ziel dieses Kapitels war es, herauszufinden, wie sich die verschiedenen cholestatischen Kinderkrankheiten und nicht-cholestatischen Vergleichsproben hinsichtlich Häufigkeit, klinischer Symptome sowie laborchemischer und histologischer Parameter unterscheiden. Zudem sollte anhand eines Fragebogens eruiert werden, unter welchen cholestatischen Symptomen die Kinder mit den verschiedenen cholestatischen Erkrankungen leiden und wie die Ansprechrate auf die Antipruritus-Medikation ist. Das Kapitel diente somit in erster Linie dazu, ein besseres Verständnis zu Pathologie, Krankheitsverlauf und besonderen Problemen der unterschiedlichen Krankheitsbilder zu entwickeln.

4.1.1. Klinische Parameter

Dieses Kapitel beschäftigte sich mit der prozentualen Verteilung der cholestatischen Krankheitsbilder sowie der Herkunft der Vergleichsproben im Patientenkollektiv dieser Arbeit. Zudem wurde untersucht, wie sich die einzelnen Krankheitsgruppen und die Vergleichsgruppe hinsichtlich Geschlechterverteilung, Alter bei Beginn der Symptome und bei Eingriff und hinsichtlich klinischer Symptome der Krankheit wie Splenomegalie und Aszites unterscheiden.

Wie in Abb. 6 gezeigt, stellte die BA im Patientenkollektiv mit $n = 56$ (73%) die größte Gruppe der cholestatischen Kinderkrankheiten dar. Die CF und die PFIC waren mit $n = 7$ (9%) bzw. $n = 4$ (5%) vertreten, während zwei Kinder (3%) unter dem ALGS und ein Kind (1%) unter dem CS litt. Die restlichen cholestatischen Krankheiten waren ebenfalls nur mit $n = 2$ (3%) oder $n = 1$ (1%) vertreten und wurden deshalb als cholestatisches Kollektiv (CK) betrachtet, sodass sie als Gruppe insgesamt $n = 7$ (9%) der cholestatischen Kinderkrankheiten repräsentierten. Die Gruppe der Vergleichsproben bestand, wie in Kap. 3.1. beschrieben, aus sieben Kindern, von denen bei drei Kindern eine Leberresektion aufgrund eines Hepatoblastoms durchgeführt wurde.

Tabelle 4 gibt Daten zur Krankheitsgeschichte sowie zu verschiedenen klinischen Symptomen der unterschiedlichen Gruppen wieder. Die Geschlechterverteilung (m:w) bei allen 84 Kindern fiel mit 46:38 etwas zugunsten der Jungen aus, da vor allem bei den Vergleichsproben mit 5:2, bei BA mit 30:26 und bei PFIC mit 3:1 etwas mehr Jungen

betroffen waren, während bei den übrigen Krankheitsgruppen die Geschlechterverteilung nahezu homogen war. Insgesamt konnte keine große Geschlechterdifferenz bei den verschiedenen Gruppen festgestellt werden.

In der Kategorie „Alter bei Symptombeginn“ zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen cholestatischen Proben und Vergleichsproben (Tab. 4). Während bei den cholestatischen Proben bis auf wenige Ausnahmen alle Kinder bereits im ersten Lebensjahr Symptome der Krankheit zeigten, wiesen bei den Vergleichsproben zwei Kinder im Alter von zwei bis fünf Jahren und fünf Kinder erst nach dem zehnten Lebensjahr Symptome auf. Bei der BA und dem ALGS zeigte sich deutlich der äußerst frühe Krankheitsbeginn mit 24 (BA) und zwei (ALGS) Kindern im ersten Lebensmonat und zwölf (BA) Kindern im 1. Lebensjahr, während bei PFIC und CS alle Kinder erst nach Ablauf des ersten Lebensmonats bis zum Alter von einem Jahr auffällig wurden. Bei den CF-Patienten wurde das Alter bei Symptombeginn nur für drei Kinder beschrieben. Die ersten Krankheitssymptome traten bei zwei Kindern schon im 1. Lebensmonat auf, bei dem dritten Kind innerhalb des 1. Lebensjahres. Auch die Kinder des cholestatischen Kollektivs wiesen die ersten Krankheitssymptome im Kleinkindalter auf.

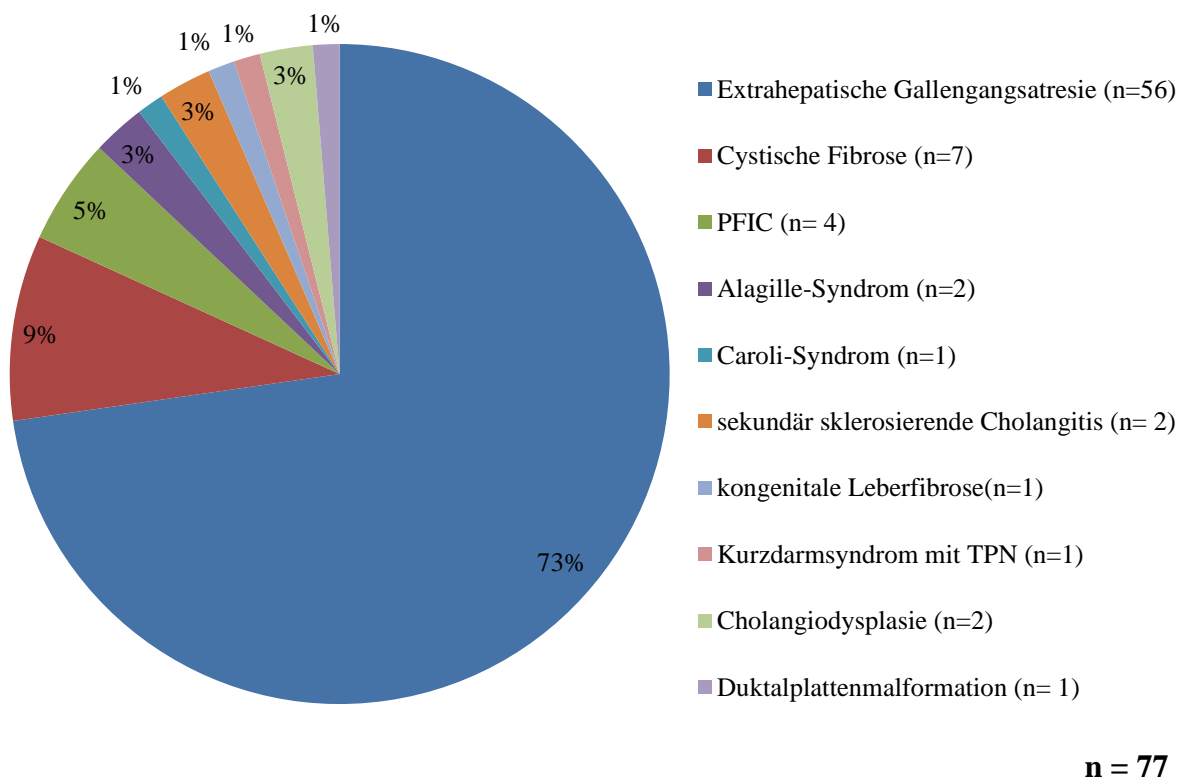


Abb. 6: Krankheitsverteilung bei cholestatischen Gewebeproben
PFIC = Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase.

Tab. 4: Klinische Parameter bei cholestatischen Erkrankungen und Vergleichsproben

Gruppe	Anzahl (m/w)	Alter bei Symptombeginn	Alter bei Eingriff	Splenomegalie (j/ n/ o.A.)	Aszites (j/ n/ o.A.)
BA	56 (30/26)	(24 / 12 / 0 / 0 / 1 / 19)	$1,8 \pm 3,3$	(45 / 2 / 9)	(42 / 7 / 7)
CF	7 (4/3)	(2 / 1 / 0 / 0 / 0 / 4)	$11,7 \pm 4,8$	(5 / 0 / 2)	(3 / 0 / 4)
PFIC	4 (3/1)	(0 / 4 / 0 / 0 / 0 / 0)	$7,6 \pm 5,5$	(4 / 0 / 0)	(3 / 0 / 1)
ALGS	2 (1/1)	(2 / 0 / 0 / 0 / 0 / 0)	$7,1 \pm 4,7$	(1 / 0 / 1)	(1 / 0 / 1)
CS	1 (0/1)	(0 / 1 / 0 / 0 / 0 / 0)	0,6	(1 / 0 / 0)	(1 / 0 / 0)
CK	7 (3/4)	(1 / 2 / 1 / 0 / 0 / 3)	$5,9 \pm 4,8$	(7 / 0 / 0)	(0 / 2 / 5)
VP	7 (5/2)	(0 / 0 / 2 / 0 / 5 / 0)	$11,4 \pm 6,4$	(3 / 3 / 1)	(0 / 2 / 5)

Das Alter bei Symptombeginn ist wie folgt kategorisiert: (1. Lebensmonat/ 1. Lebensjahr/ 2.-5. Lebensjahr/ 6.-10. Lebensjahr/ > 10. Lebensjahr/ ohne Angabe). Die Angaben zu „Alter bei Eingriff“ sind in Jahren und als Mittelwert \pm 1 Standardabweichung (SD) angegeben.

m = männlich, w = weiblich, j = ja, n = nein, o.A. = ohne Angabe, BA = Biliäre Atresie/Extrahepatische Gallengangatresie, CF = Cystische Fibrose, PFIC = Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase, ALGS = Alagille-Syndrom, CS = Caroli-Syndrom, CK = cholestatisches Kollektiv, VP = Vergleichsproben.

Hier zeigte sich jedoch eine heterogene Verteilung. Während ein Kind bereits im 1. Lebensmonat Symptome hatte, litten zwei Kinder erst im Laufe des 1. Lebensjahres und ein Kind erst im Alter von zwei bis fünf Jahren unter cholestatischen Symptomen.

In der Kategorie „Alter bei Eingriff“ zeigten sich große Unterschiede in den unterschiedlichen Gruppen. Während das Kind mit CS mit 0,6 Jahren und die Kinder mit BA mit $1,8 \pm 3,3$ Jahren meist im Kleinkindalter operiert wurden, erhielten die Kinder mit PFIC, ALGS und die Kinder des cholestatischen Kollektivs ihren Eingriff im Mittel einige Jahre später im Kindesalter (Tab. 4). Die CF-Patienten und die Vergleichsprobengruppe wurden dagegen mit $11,7 \pm 4,8$ und $11,4 \pm 6,4$ Jahren im Durchschnitt erst im Alter um die Pubertät operiert oder biopsiert.

Eine Splenomegalie lag in der Sonographie bis auf zwei Ausnahmen (BA) bei allen bekannten Fällen mit Cholestase vor, während bei den Vergleichsproben nur drei der sieben Kinder eine Splenomegalie aufwiesen, davon zwei Kinder mit Hepatoblastom und das Kind mit Leberfibrose Grad 1 (Tab. 4). Aszites lag bei den Vergleichsproben bei den zwei Fällen, die darauf untersucht wurden, nicht vor, während bei den cholestatischen Proben bei 59 bekannten Fällen 50 Kinder unter Aszites litten.

4.1.2. Histopathologische Parameter

In diesem Kapitel wurde untersucht, wie sich die cholestatischen Krankheitsbilder und Vergleichsproben hinsichtlich histopathologischer Parameter präsentieren. Im Einzelnen wurde die Art der Probengewinnung, das Vorhandensein von Zirrhose und

Gallengangsproliferaten sowie der Schweregrad an Inflammation und Cholestase betrachtet. Tabelle 5 fasst die histologischen Parameter der untersuchten Lebergewebeproben zusammen.

Bei allen cholestatischen Erkrankungen sowie bei den Vergleichsproben mit Hepatoblastom wurde als Eingriff eine Leberresektion vorgenommen. Lediglich bei den übrigen vier Vergleichsproben wurde das Lebergewebe durch eine Biopsie gewonnen.

Bei sämtlichen cholestatischen Erkrankungen fand sich histologisch eine Leberzirrhose, während die bekannten Fälle der Vergleichsproben keine Anzeichen einer Zirrhose und keine oder in zwei Fällen nur eine leichte Entzündung aufwiesen. Bei den cholestatischen Erkrankungen lag häufig eine leichte ($n = 33$) oder mittelgradige ($n = 6$) Entzündung vor. Lediglich vier Kinder mit BA wiesen eine schwere Inflammation auf, weitere acht Kinder (4x BA, 1x ALGS und 3x cholestatisches Kollektiv) zeigten keinerlei Anzeichen einer Entzündung. Bei 17 Kindern (12x BA, 4x CF, 1x CS) lag histologisch zwar eine Inflammation, jedoch ohne Angabe des Schweregrades vor.

Bei den vier histopathologisch untersuchten Fällen der Vergleichsproben konnten keine Anzeichen einer Cholestase gefunden werden, während die Kinder mit cholestatischen Erkrankungen bis auf fünf Ausnahmen alle auch histologisch unter einer Cholestase litten. Drei Kinder mit BA sowie jeweils ein Kind mit ALGS und aus dem cholestatischen Kollektiv zeigten histologisch keine Cholestase. 35 der 45 untersuchten Gewebeproben von Kindern mit BA wiesen eine schwere Form der Cholestase auf, ebenso das Kind mit CS sowie zwei Kinder mit PFIC und jeweils ein Kind mit CF und aus dem cholestatischen Kollektiv. Gallengangsproliferate konnten, soweit angegeben, bei allen cholestatischen Erkrankungen nachgewiesen werden, nicht jedoch bei der einen Vergleichsprobe, die dahingehend untersucht wurde.

4.1.3. Laborchemische Parameter

Dieses Kapitel betrachtete verschiedene Serummarker für Cholestase (AP, Gesamt-Bilirubin, Gesamt-Gallensäuren, γ GT), Leberzellschaden (GOT, GPT, GLDH, LDH), Lebersyntheseleistung (CHE, Gesamteiweiß, Quick-Wert) und für Entzündung (CRP). Die laborchemischen Parameter der unterschiedlichen Gruppen werden in Tab. 6 jeweils als Mittelwert \pm 1 Standardabweichung (SD) zusammengefasst. Ein * markiert, ob sich der errechnete Mittelwert statistisch signifikant ($p < 0,05$) von dem jeweiligen Wert der Vergleichsproben unterscheidet.

Tab. 5: Histologische Parameter bei cholestatischen Erkrankungen und Vergleichsproben

Gruppe	Gewebe- typ	Zirrhose (j/ n/ o.A.)	Inflammationsgrad (n/ l/ m/ s/ v/ o.A.)	Cholestasegrad (n/ l/ m/ s/ o.A.)	Gallen- gangs- Prolifera- te (j/ n/ o.A.)
BA (n = 56)	(56/0)	(56 / 0 / 0)	(4 / 24 / 3 / 4 / 12 / 9)	(3 / 4 / 3 / 35 / 11)	(53 / 0 / 3)
CF (n = 7)	(7/0)	(6 / 0 / 1)	(0 / 2 / 0 / 0 / 4 / 1)	(1 / 1 / 0 / 1 / 4)	(6 / 0 / 1)
PFIC (n = 4)	(4/0)	(4 / 0 / 0)	(0 / 2 / 2 / 0 / 0 / 0)	(0 / 2 / 0 / 2 / 0)	(3 / 0 / 1)
ALGS (n = 2)	(2/0)	(2 / 0 / 0)	(1 / 0 / 1 / 0 / 0 / 0)	(0 / 0 / 0 / 0 / 2)	(0 / 0 / 2)
CS (n = 1)	(1/0)	(1 / 0 / 0)	(0 / 0 / 0 / 0 / 1 / 0)	(0 / 0 / 0 / 1 / 0)	(1 / 0 / 0)
CK (n = 7)	(7/0)	(7 / 0 / 0)	(3 / 3 / 0 / 0 / 0 / 1)	(1 / 0 / 0 / 1 / 5)	(6 / 0 / 1)
VP (n = 7)	(3/4)	(0 / 3 / 4)	(3 / 2 / 0 / 0 / 0 / 2)	(4 / 0 / 0 / 0 / 3)	(0 / 1 / 6)

Angegeben ist die Anzahl n. Der Gewebetyp ist wie folgt kategorisiert: (Resektion/ Biopsie).

j= ja, n = nein, o.A. = ohne Angabe, l = leicht, m = mittelgradig, s= schwer, v = vorhanden ohne Angabe des Schweregrades, BA = Biliäre Atresie/Extrahepatische Gallengangsatresie, CF = Cystische Fibrose, PFIC = Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase, ALGS = Alagille-Syndrom, CS = Caroli-Syndrom, CK = cholestatisches Kollektiv, VP = Vergleichsproben.

Der Cholestasemarker AP zeigte sich vor allem bei BA, dem cholestatischen Kollektiv und PFIC erhöht, was statistisch nur für BA und für das cholestatische Kollektiv bewiesen wurde. Ein Anstieg der Serumwerte des Gesamt-Bilirubins und der Gallensäuren im Serum konnte bei allen cholestatischen Erkrankungen im Vergleich zu den Kontrollproben beobachtet werden, war jedoch statistisch nur für BA (Gesamt-Bilirubin und Gesamt-Gallensäuren) und PFIC (Gesamt-Bilirubin) nachweisbar. CF-Patienten wiesen dabei tendenziell eine mildere Erhöhung auf als Kinder mit anderen cholestatischen Krankheiten, während sich die stärksten Erhöhungen bei der BA, dem ALGS und dem CS zeigten. Bei den beiden letztgenannten Krankheiten konnten jedoch aufgrund der niedrigen Fallzahlen keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Der Cholestasemarker γ GT wies bei Vergleichsproben und dem ALGS Normwerte auf und war bei CF mäßig und bei den restlichen cholestatischen Erkrankungen stark erhöht. Bei BA zeigte sich dies auch statistisch.

Die Leberenzyme GOT und GPT, die einen Leberschaden anzeigen, waren beim cholestatischen Kollektiv etwas, bei allen anderen cholestatischen Erkrankungen deutlich erhöht. Statistisch nachweisbar war dies jedoch auch hier nur bei BA (GOT, GPT) und bei PFIC (GOT). Die restlichen Marker für Leberschaden, GLDH und LDH, zeigten sich bei den Gruppen im Vergleich zu den Kontrollproben unverändert. Bei BA und CS wirkte die GLDH

Tab. 6: Laborchemische Parameter bei cholestatischen Erkrankungen und Vergleichsproben

Gruppe	AP (U/l)	Bili gesamt (mg/dl)	GSgesamt (μ mol/l)	γ GT (U/l)	GOT (U/l)	GPT (U/l)
BA (56)	589 \pm 300*	12,3 \pm 8,9*	277 \pm 131*	218 \pm 202*	224 \pm 147*	141 \pm 116*
CF (7)	275 \pm 93	2,2 \pm 3,4	78 \pm 102	45 \pm 65	1678 \pm 4282	271 \pm 621
PFIC (4)	341 \pm 60	3,0 \pm 1,7*	102 \pm 67	163 \pm 166	165 \pm 13*	162 \pm 83
ALGS (2)	275 \pm 207	19,4 \pm 23,3	421 \pm 213	39 \pm 6	132 \pm 11	106 \pm 25
CS (1)	216	23,8	287	154	283	120
CK (7)	541 \pm 388*	1,4 \pm 0,9	210 \pm 173	301 \pm 550	92 \pm 55	57 \pm 25
VP (7)	248 \pm 98	0,9 \pm 0,8	11 \pm 4	38 \pm 20	59 \pm 31	83 \pm 98
	GLDH (U/l)	LDH (U/l)	CHE (U/l)	Gesamteiweiß (g/l)	Quick (%)	CRP (mg/l)
BA (56)	46,1 \pm 155,6	374 \pm 262	4900 \pm 2414*	56 \pm 10*	63 \pm 20*	14,1 \pm 13,5*
CF (7)	2,5 \pm 1,7	222 \pm 47	6825 \pm 2795*	68 \pm 6	49 \pm 11*	11,3 \pm 18,4
PFIC (4)	5,8 \pm 2,3	286 \pm 58	4775 \pm 3616*	72 \pm 3	68 \pm 18	7,1 \pm 9,3
ALGS (2)	6,5 \pm 1,8	254 \pm 21	3238 \pm 2153	56 \pm 20	61 \pm 47	15,2 \pm 21,2
CS (1)	39,5	258	8052	58	40	75,6
CK (7)	9,3 \pm 10,1	263 \pm 99	7550 \pm 2279*	67 \pm 7	72 \pm 22	5,4 \pm 9,7
VP (7)	9,7 \pm 10,2	256 \pm 67	12543 \pm 2753	72 \pm 9	82 \pm 14	2,8 \pm 0,0

Die Werte sind als Mittelwert \pm 1 SD angegeben. * = im Vergleich zu Kontrollproben (VP) mit $p < 0,05$ signifikant unterschiedlich. Die Zahl in Klammern hinter der Krankheitsgruppe gibt die Anzahl n wieder.

AP = Alkalische Phosphatase, Bili = Bilirubin, GS = Gallensäuren, γ GT = Gamma-Glutamyl-Transferase, GOT = Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, GPT = Glutamat-Pyruvat-Transaminase, GLDH = Glutamatdehydrogenase, LDH = Laktatdehydrogenase, CHE = Cholinesterase, CRP = C-reaktives Protein, BA = Biliäre Atresie/Extrahepatische Gallengangatresie, CF = Cystische Fibrose, PFIC = Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase, ALGS = Alagille-Syndrom, CS = Caroli-Syndrom, CK = cholestatisches Kollektiv, VP = Vergleichsproben.

erhöht, es konnten jedoch bei keiner Krankheitsgruppe statistisch signifikante Veränderungen gezeigt werden.

CHE stellt einen Marker für die Lebersyntheseleistung dar und war bei allen cholestatischen Erkrankungen im Vergleich zu den Kontrollproben vermindert. Bei BA, CF, PFIC und dem cholestatischen Kollektiv zeigte sich hierbei auch statistisch eine signifikante Reduktion. Die Synthesemarker Gesamteiweiß und Quick-Wert wiesen bei einigen cholestatischen Krankheiten eine mäßige Reduktion auf. Statistisch stellte sich das Gesamteiweiß lediglich bei BA signifikant vermindert da. Der Quick-Wert war vor allem beim CS sowie bei CF und BA sichtbar erniedrigt. Eine statistisch signifikante Reduktion konnte allerdings nur für BA und CF nachgewiesen werden. Der Entzündungsmarker CRP zeigte sich bei den Vergleichsproben leicht, beim CS stark und bei den restlichen cholestatischen Erkrankungen mäßig erhöht. Eine statistische Signifikanz war nur bei BA feststellbar.

Insgesamt zeichnete sich die BA durch deutlich negative Veränderungen in den Kategorien Cholestase, Leberschaden, Lebersyntheseminderung und Inflammation aus. Auch der Patient mit CS wies eine starke Beeinträchtigung in allen Kategorien auf, was statistisch jedoch nicht nachgewiesen werden konnte. Cholestase, Leberschaden, Syntheseminderung und Entzündung waren auch hier von den Serumwerten her deutlich ausgeprägt.

Bei den Kindern mit CF schien die Cholestase mit nur leicht erhöhten Werten von Bilirubin und Gallensäuren insgesamt eher schwach ausgeprägt. Lebersyntheseminderung und Entzündung schienen hier im Vordergrund zu stehen. Bei den Kindern mit PFIC zeigte sich die Cholestase durch signifikant erhöhte Bilirubinwerte. Zudem lagen auch deutliche Anzeichen von Leberzellschaden und Syntheseminderung und leichte Entzündungszeichen vor. Beim ALGS wurde die Cholestase vor allem durch die erhöhten Bilirubin- und Gallensäurewerte im Serum deutlich, während sich AP und γ GT eher im Normbereich bewegten. Auch hier zeigten sich klar Lebersyntheseminderung, Leberschaden und Entzündung. Das cholestatische Kollektiv wies nur einen mäßigen Leberschaden und lediglich bei Betrachtung der CHE eine Syntheseminderung auf. Cholestase und eine mittelgradige Entzündung schienen hier führend. Bei den Vergleichsproben ließen sich anhand der etwas erhöhten GPT und CRP-Werte eine leichte Leberzellbeteiligung und Inflammation erkennen. Die restlichen Parameter wiesen jedoch alle Normwerte auf.

4.1.4. Cholestatische Symptome

Wie in Kap. 3.2.2. erklärt, wurden die Symptome Hautikterus, Sklerenikterus, Juckreiz, dunkler Urin und acholischer Stuhl sowie die Frage, ob die Kinder auf die jeweilige Antipruritus-Medikation angesprochen haben, in Form eines Fragebogens an die Eltern eruiert. Insgesamt konnte ein positiver Rücklauf des Fragebogens von 27 Familien verzeichnet werden. Dies entspricht 35% aller an Cholestase erkrankten Kinder. Wie in Tab. 7 gezeigt, litten von den 27 Kindern 16 Kinder an BA, jeweils drei Kinder an CF und PFIC und zwei Kinder am ALGS. Drei Kinder entstammten dem cholestatischen Kollektiv.

Bezüglich Haut- und Sklerenikterus fiel auf, dass ein Großteil der Kinder unter diesen Symptomen litt. Während von dem Symptom Hautikterus 17 der 27 Kinder betroffen waren, darunter 75% der Kinder mit BA (zwölf von 16), waren sogar 22 der 27 Kinder von Sklerenikterus betroffen. Insgesamt fünf Kinder (3x BA, 1x PFIC und 1x cholestatisches Kollektiv) litten nicht an Hautikterus, jedoch an Sklerenikterus. Fünf weitere Kinder litten weder an Haut- noch an Sklerenikterus, darunter alle drei Kinder mit CF.

Tab. 7: Ergebnisse des Fragebogens zu cholestatischen Symptomen

gültig	BA	CF	PFIC	ALGS	CK	gesamt
	16	3	3	2	3	27
Hautikterus						27
Nein	4	3	1	0	2	10
Ja	12	0	2	2	1	17
Sklerenikterus						27
Nein	1	3	0	0	1	5
Ja	15	0	3	2	2	22
Juckreiz						27
Nein	10	3	0	0	0	13
Ja	6	0	3	2	3	14
Acholischer Stuhl						26
Nein	2	1	0	0	1	4
Ja	14	1	3	2	2	22
Dunkler Urin						25
Nein	5	3	1	0	2	11
Ja	11	0	1	1	1	14
Ansprechen						27
Nein	4	0	3	1	2	10
Ja	2	0	0	1	1	4
Kein Juckreiz	10	3	0	0	0	13

Alle Werte stehen für Anzahl n.

BA = Biliäre Atresie/ Extrahepatische Gallengangsatresie, CF = Cystische Fibrose, PFIC = Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase, ALGS = Alagille-Syndrom, CK = cholestatisches Kollektiv.

Das Symptom Juckreiz war weit weniger häufig. Nur etwas mehr als die Hälfte der Kinder (14 von 27) war davon betroffen. Hier fiel auf, dass jeweils alle Kinder mit PFIC, ALGS und aus dem cholestatischen Kollektiv an Juckreiz litten, während die Kinder mit CF allesamt keinen Juckreiz hatten. Nur sechs der 16 Kinder (37,5%) mit BA wiesen das Symptom Juckreiz auf.

22 von 26 Familien gaben an, bei ihrem Kind acholischen Stuhl bemerkt zu haben. Nur bei vier Kindern (2x BA, 1x CF, 1x CK) lag dieses Symptom nicht vor. Dunklen Urin bemerkten dagegen nur 14 von 25 Familien, während zwei Familien diese Frage nicht beantwortet haben. Bei elf der 16 Kinder mit BA konnte dunkler Urin festgestellt werden. Die Kinder mit CF wiesen allesamt keinen dunklen Urin auf.

Hinsichtlich der Frage, ob die Kinder mit Juckreiz auf die jeweilige Antipruritus-Medikation angesprochen haben, konnten drei Gruppen gebildet werden. 13 der 27 Kinder litten, wie oben schon erklärt, nicht unter Juckreiz. Von den restlichen 14 Kindern, die Juckreiz hatten, sprachen zehn Kinder nicht auf die Antipruritus-Medikation an. Bei BA waren 66,6% der

Kinder (vier von sechs) Non-Responder. Insgesamt konnte nur bei vier Kindern (2x BA, 1x ALGS, 1x CK) mit Juckreiz ein Erfolg des jeweiligen Medikaments festgestellt werden.

Zusammenfassend waren die Symptome Sklerenikterus und acholischer Stuhl bei fast allen Kindern vorhanden, die Mehrheit der Kinder litt zudem unter Hautikterus. Die cholestatischen Symptome dunkler Urin und Juckreiz waren nur bei etwas mehr als der Hälfte der Kinder nachzuweisen. Nur ein kleiner Teil der Kinder (vier von 14) erlebte durch die Antipruritus-Medikation eine Besserung. Kinder mit CF waren insgesamt kaum von cholestatischen Symptomen betroffen. Lediglich ein Kind wies acholischen Stuhl auf. Bei PFIC und ALGS litten dagegen fast alle Kinder an sämtlichen cholestatischen Symptomen und nur ein Kind mit ALGS sprach auf die Medikation an. Bei BA lagen alle cholestatischen Symptome bei der großen Mehrheit der Kinder vor. Nur das Symptom Juckreiz schien hier mit 37,5% betroffener Kinder weniger stark ausgeprägt. Beim cholestatischen Kollektiv zeigte sich der heterogene Ursprung der Kinder auch hinsichtlich der cholestatischen Symptome. Es gab bei jedem Symptom etwa gleich viele Kinder, die darunter litten, wie Kinder, die von dem Symptom verschont blieben. Nur an Juckreiz litten alle drei Kinder des cholestatischen Kollektivs.

4.2. Expression hepatobiliärer Transporter und nukleärer Rezeptoren in cholestatischen Gewebeproben und Vergleichsproben

Im Folgenden wurde die Genexpression von zehn verschiedenen hepatobiliären Transportern sowie vier nukleären Rezeptoren, bei den Krankheitsbildern BA, CF, PFIC, ALGS und CS im Vergleich zu den Kontrollproben untersucht. Die Abb. 7-10 stellen die Genexpression bei den verschiedenen Krankheitsbildern mithilfe von Boxplots nebeneinander dar, sodass verstärkte oder verminderte Expressionen erkannt werden können. Abbildung 7 widmet sich den basolateralen Aufnahmetransportern, während Abb. 8 die kanalikulären Effluxmechanismen und die Expression des Cholangiozytentransporters CFTR darstellt. Abbildung 9 zeigt die Genexpressionen der basolateralen Effluxmechanismen, Abb. 10 widmet sich den nukleären Rezeptoren. Im Vergleich zu den Kontrollproben signifikant veränderte Genexpressionen wurden mit * für $p < 0,05$ und mit ** für $p < 0,01$ markiert. Tabelle 8 fasst die in dieser Arbeit gefundenen adaptiven Mechanismen bei den fünf cholestatischen Krankheitsbildern zusammen. ↑ und ↓ zeigen dabei an, dass der jeweilige Transporter oder nukleäre Rezeptor bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ im Vergleich zu den Kontrollproben vermehrt oder

Tab. 8: Zusammenfassung der Genexpressionsunterschiede hepatobiliärer Transporter und nukleärer Rezeptoren zwischen verschiedenen cholestatischen Erkrankungen und Vergleichsproben

Gruppe	NTCP	OATP2	MRP2	MDR1	MDR3	FIC1	CFTR
BA (n = 56)	↓↓	↓↓	-	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
CF (n = 7)	-	-	-	-	-	-	-
PFIC (n = 4)	-	↓	-	↑	↑↑	-	-
ALGS (n = 2)	-	-	-	-	-	-	-
CS (n = 1)	-	-	-	-	-	-	-
	MRP3	MRP4	OST α/β	FXR	SHP	PXR	CAR
BA (n = 56)	-	↑↑	↑↑	-	-	↓↓	↓
CF (n = 7)	-	-	-	-	-	-	-
PFIC (n = 4)	-	↑	↑	-	-	-	-
ALGS (n = 2)	-	-	-	-	-	-	-
CS (n = 1)	-	-	-	-	-	-	-

↑/↓ = im Vergleich zu Kontrollproben (VP) mit n = 7 mit p < 0,05 vermehrt/ vermindert exprimiert,

↑↑/↓↓ = im Vergleich zu Kontrollproben mit p < 0,01 vermehrt/ vermindert exprimiert.

NTCP = Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide, OATP = Organic-Anion-Transporting-Polypeptide, MRP = Multidrug-Resistance-Related-Protein, MDR = Multiple-Drug-Resistance-Protein, FIC = Familial-Intrahepatic-Cholestasis-Protein, CFTR = Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator, OST = Organic-Solute-Transporter, FXR = Farnesoid-X-Rezeptor, SHP = Small-Heterodimer-Partner, PXR = Pregnane-X-Rezeptor, CAR = Constitutive-Androstane-Rezeptor, BA = Biliäre Atresie/ Extrahepatische Gallengangatresie, CF = Cystische Fibrose, PFIC = Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase, ALGS = Alagille-Syndrom, CS = Caroli-Syndrom.

vermindert exprimiert vorlag. ↑↑ und ↓↓ kennzeichnen ein Signifikanzniveau von p < 0,01. Anhang E stellt in Tab. 13 die dazugehörigen p-Werte für die jeweiligen Krankheitsbilder dar.

4.2.1. Basolaterale Aufnahmetransporter

Die basolateralen Aufnahmetransporter NTCP (Abb. 7A) und OATP2 (Abb. 7B) zeigten sich bei BA im Vergleich zu den Kontrollproben statistisch signifikant reduziert. Während bei den restlichen cholestatischen Krankheitsbildern kein relevanter Genexpressionsunterschied von NTCP festgestellt werden konnte, lag bei OATP2 auch bei PFIC eine signifikante Verminderung der RNA vor. Bei den Krankheitsbildern ALGS und CS schienen beide Transporter anhand der Grafiken in reduzierter Form vorzuliegen. Aufgrund der geringen Fallzahlen konnte hier jedoch keine statistisch verlässliche Aussage getroffen werden (Tab. 8 und Anhang E, Tab. 13).

4.2.2. Kanalikuläre Effluxmechanismen und Cholangiozytentransporter

Bei dem Effluxmechanismus MRP2 (Abb. 8A) konnte bei keiner cholestatischen Krankheitsgruppe ein statistisch signifikanter Genexpressionsunterschied im Vergleich zu den Kontrollproben gefunden werden (Tab. 8 und Anhang E, Tab. 13).

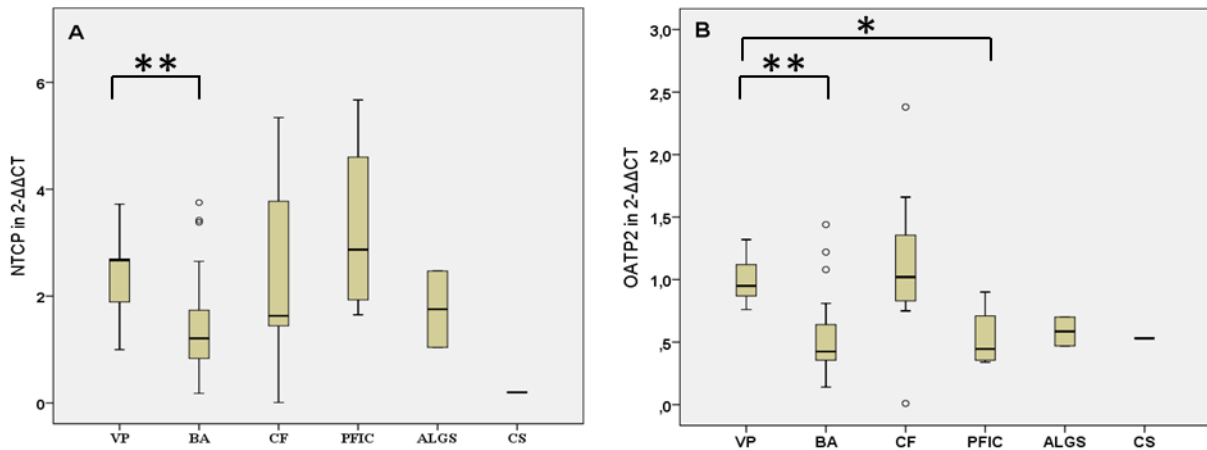


Abb. 7: Genexpression basolateraler Aufnahmetransporter bei verschiedenen cholestatischen Erkrankungen und Vergleichsproben

*/ ** = bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ / $p < 0,01$ im Vergleich zu Kontrollproben (VP) mit $n = 7$ signifikant unterschiedlich.

NTCP = Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide, OATP = Organic-Anion-Transporting-Polypeptide, VP = Vergleichsproben ($n = 7$), BA = Biliäre Atresie/ Extrahepatische Gallengangsatesie ($n = 56$), CF = Cystische Fibrose ($n = 7$), PFIC = Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase ($n = 4$), ALGS = Alagille-Syndrom ($n = 2$), CS = Caroli-Syndrom ($n = 1$).

Der MRP2-Transporter schien jedoch anhand der Abb. 8A beim ALGS und CS tendenziell etwas stärker exprimiert zu sein.

Die Transporter MDR1 (Abb. 8B) und MDR3 (Abb. 8C) waren bei BA und PFIC signifikant erhöht, während sich FIC1 (Abb. 8D) nur bei BA statistisch signifikant nach oben reguliert zeigte. Auch bei diesen drei Effluxmechanismen ließ die jeweilige Grafik auf eine vermehrte Expression der Gene bei den Krankheitsbildern ALGS und CS schließen. Beim Cholangiozytentransporter CFTR (Abb. 8E) fand sich eine signifikante Aktivierung beim Krankheitsbild BA. Graphisch wirkte dieser Transporter jedoch auch beim CS verstärkt exprimiert. Beim Krankheitsbild CF konnten im Vergleich zu den Kontrollproben keine signifikanten Expressionsunterschiede hinsichtlich des CFTR-Transporters festgestellt werden (Tab. 8 und Anhang E, Tab. 13).

4.2.3. Basolaterale Effluxmechanismen

Die basolaterale Effluxpumpe MRP3 (Abb. 9A) wies bei keiner Krankheitsgruppe eine signifikant verstärkte oder verminderte Expression auf, während MRP4 (Abb. 9B) und OST α/β (Abb. 9C) bei BA und PFIC statistisch signifikant erhöht waren. Bei allen drei Transportmechanismen ließ sich eine verstärkte Expression bei den Krankheitsbildern ALGS und CS erahnen.

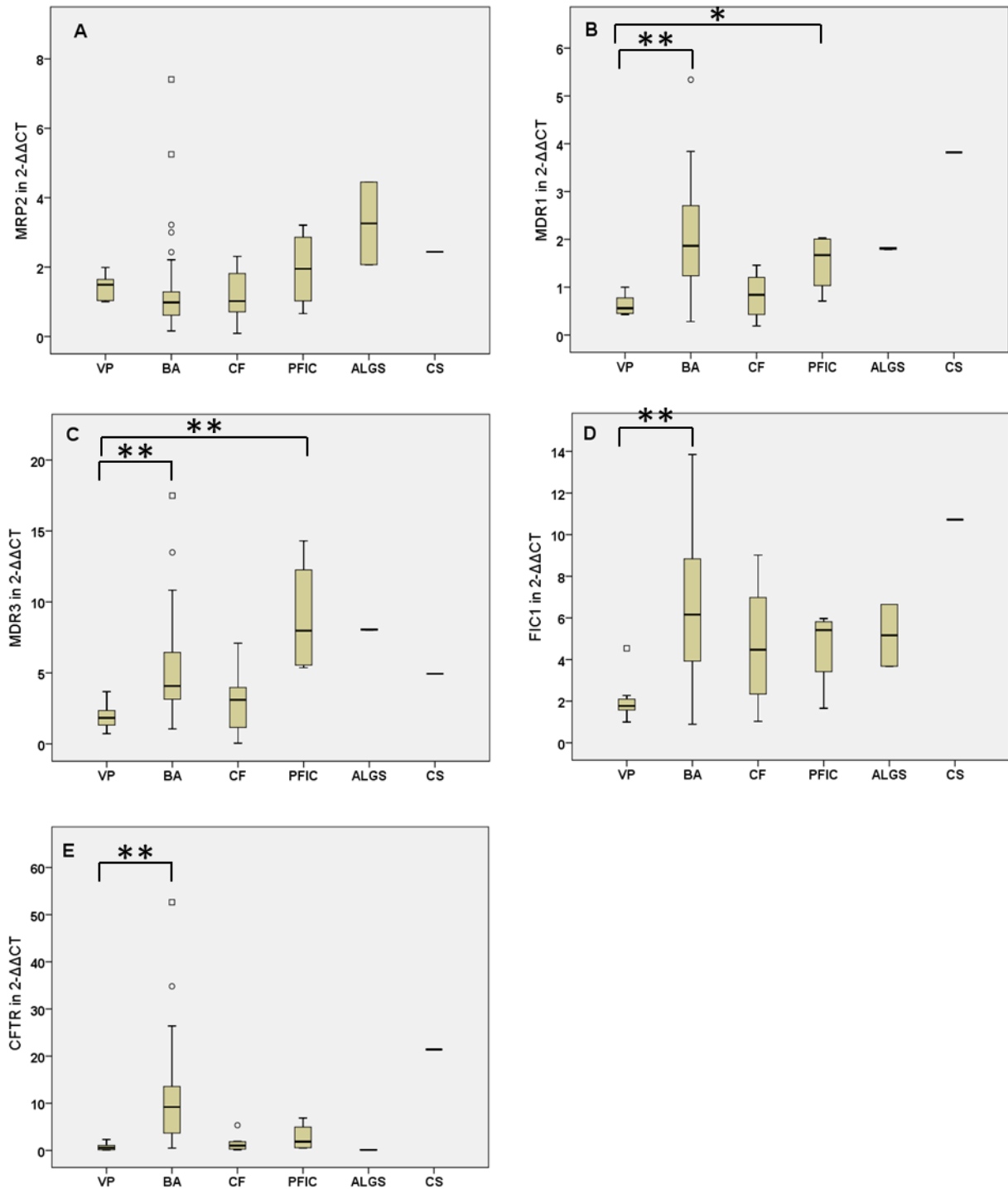


Abb. 8: Genexpression kanalikulärer Effluxtransporter und des Cholangiozytentransporters CFTR bei verschiedenen cholestatischen Erkrankungen und Vergleichsproben

*/ ** = bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ / $p < 0,01$ im Vergleich zu Kontrollproben (VP) mit $n = 7$ signifikant unterschiedlich.

MRP = Multidrug-Resistance-Related-Protein, MDR = Multiple-Drug-Resistance-Protein, FIC = Familial-Intrahepatic-Cholestasis-Protein, CFTR = Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator, VP = Vergleichsproben ($n = 7$), BA = Biliäre Atresie/ Extrahepatische Gallengangatresie ($n = 56$), CF = Cystische Fibrose ($n = 7$), PFIC = Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase ($n = 4$), ALGS = Alagille-Syndrom ($n = 2$), CS = Caroli-Syndrom ($n = 1$).

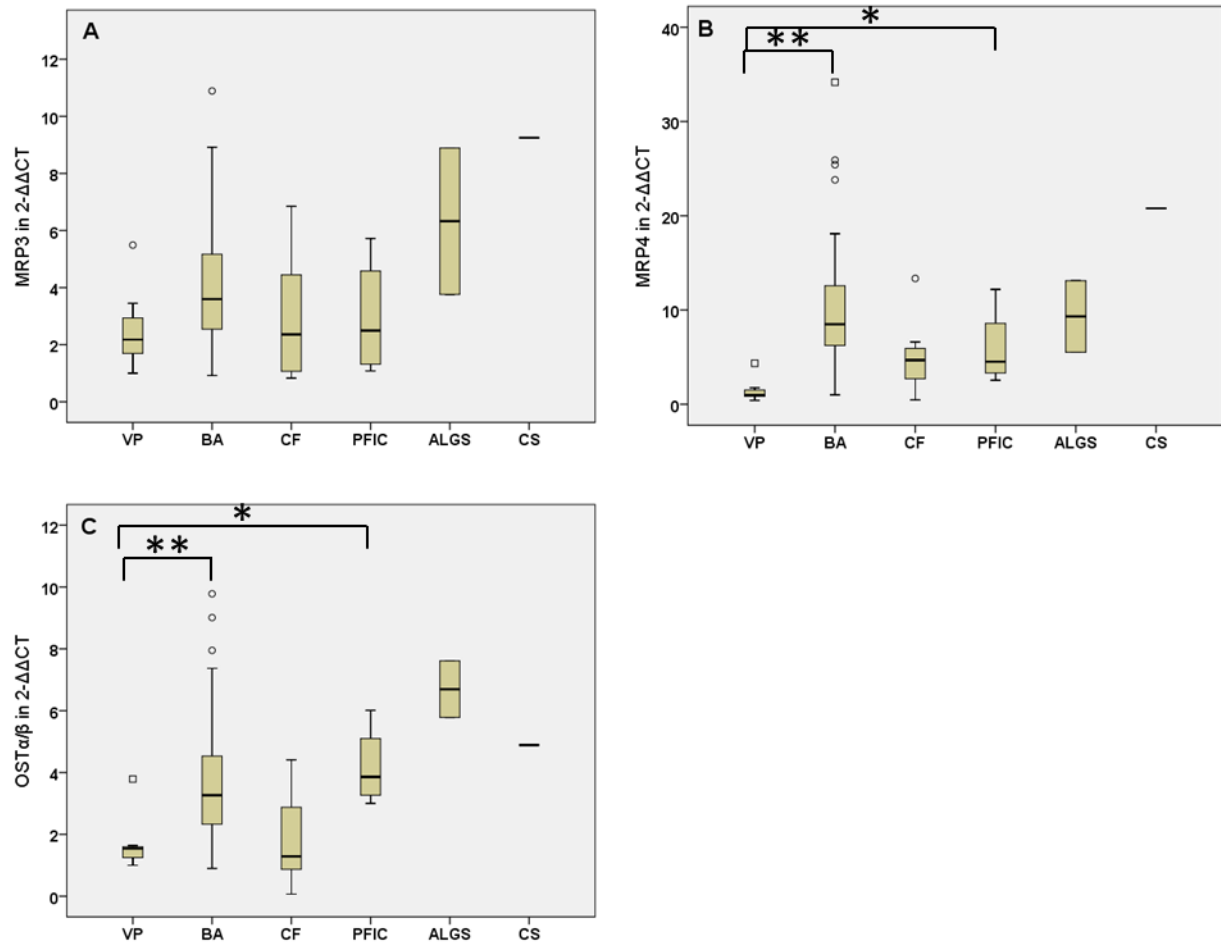


Abb. 9: Genexpression basolateraler Effluxtransporter bei verschiedenen cholestatischen Erkrankungen und Vergleichsproben

*/ ** = bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ / $p < 0,01$ im Vergleich zu Kontrollproben (VP) mit $n = 7$ signifikant unterschiedlich.

MRP = Multidrug-Resistance-Related-Protein, OST = Organic-Solute-Transporter, VP = Vergleichsproben ($n = 7$), BA = Biliäre Atresie/ Extrahepatische Gallengangsatresie ($n = 56$), CF = Cystische Fibrose ($n = 7$), PFIC = Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase ($n = 4$), ALGS = Alagille-Syndrom ($n = 2$), CS = Caroli-Syndrom ($n = 1$).

4.2.4. Nukleäre Rezeptoren

Weder bei dem nukleären Rezeptor FXR (Abb. 10A) noch bei SHP (Abb. 10B) zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen cholestatischen Krankheitsgruppen und den Vergleichsproben. Bei PXR (Abb. 10C) und CAR (Abb. 10D) lag eine statistisch signifikante Reduktion beim Krankheitsbild BA vor.

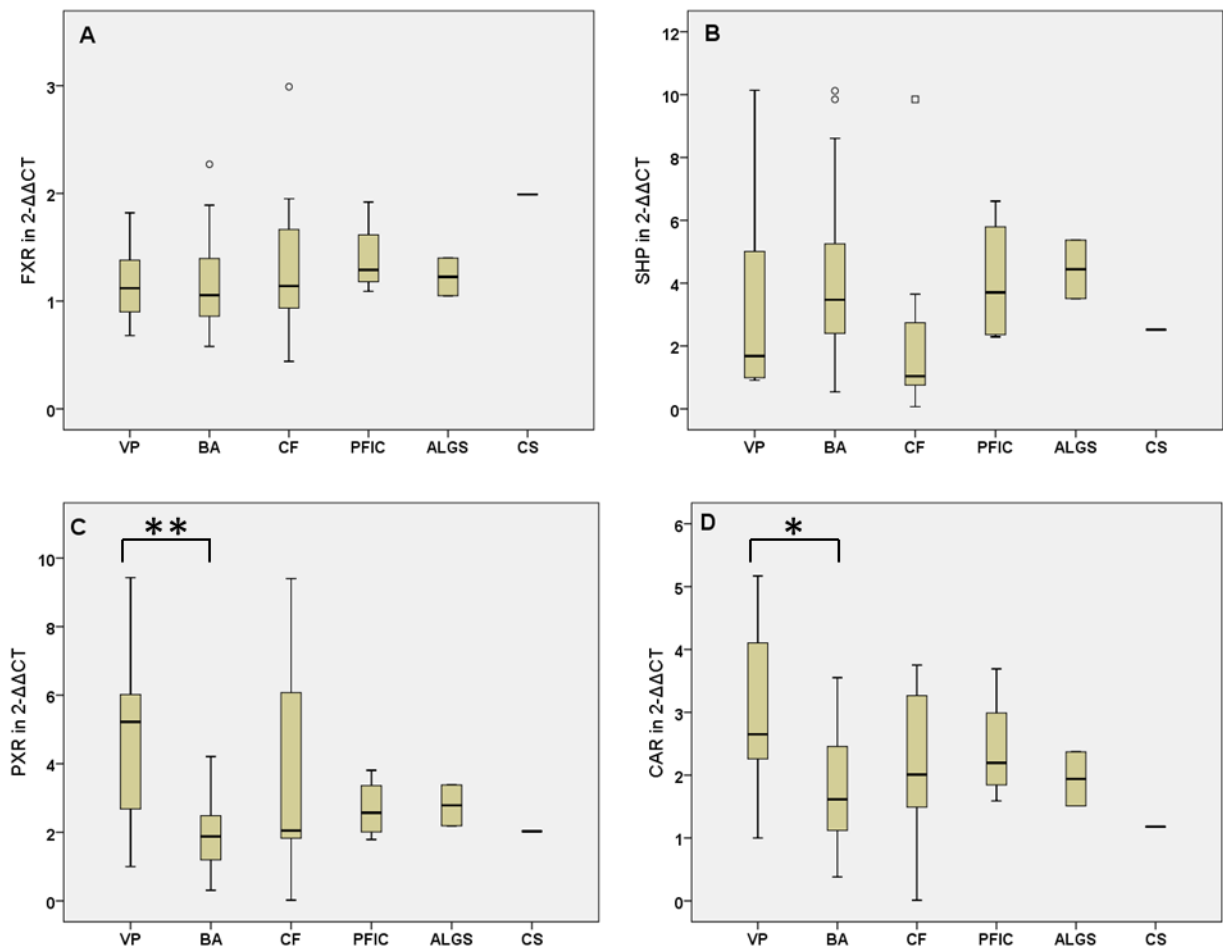


Abb. 10: Genexpression nukleärer Rezeptoren bei verschiedenen cholestatischen Erkrankungen und Vergleichsproben

*/ ** = bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ / $p < 0,01$ im Vergleich zu Kontrollproben (VP) mit $n = 7$ signifikant unterschiedlich.

FXR = Farnesoid-X-Rezeptor, SHP = Small-Heterodimer-Partner, PXR = Pregnane-X-Rezeptor, CAR = Constitutive-Androstane-Rezeptor, VP = Vergleichsproben ($n = 7$), BA = Biliäre Atresie/ Extrahepatische Gallengangatresie ($n = 56$), CF = Cystische Fibrose ($n = 7$), PFIC = Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase ($n = 4$), ALGS = Alagille-Syndrom ($n = 2$), CS = Caroli-Syndrom ($n = 1$).

4.3. Korrelation der mRNA-Expression von nukleären Rezeptoren und hepatobiliären Transportern und mögliche regulatorische Zusammenhänge

In diesem Kapitel wurde der lineare Zusammenhang zwischen der Expression der nukleären Rezeptoren FXR, SHP, PXR und CAR und der Expression der hepatobiliären Transporter in allen Kindergewebeproben ($n = 84$), cholestatischen Proben sowie Vergleichsproben, untersucht. Ziel war es, zu erkennen, ob sich die Expression bestimmter Transporter proportional zur Expression bestimmter nukleärer Rezeptoren verhält, was auf mögliche regulatorische

Zusammenhänge hindeuten könnte. Um dies zu untersuchen wurden Streudiagramme mit einer Ausgleichsgeraden für alle Konstellationen erstellt und der jeweilige Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet. Zusätzlich wurde der lineare Zusammenhang zwischen den beiden nukleären Rezeptoren FXR und SHP untersucht, da eine Regulation von SHP durch FXR bereits beschrieben wurde (8). Im Anhang F, Tab.14 sind als Überblick die Pearson-Korrelationskoeffizienten aller Konstellationen angegeben. Von einer deutlich positiven oder negativen Korrelation wird ab einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von $\geq 0,5$ oder $\leq -0,5$ ausgegangen. Konstellationen, bei denen dies zutraf, sind im Anhang F, Tab. 14 durch eine dicke Umrandung gekennzeichnet. Im Folgenden sind Streudiagramme von Konstellationen abgebildet, bei denen bereits in der Literatur ein regulatorischer Zusammenhang gefunden wurde sowie Streudiagramme, die aufgrund aussagekräftiger Korrelationskoeffizienten Hinweise auf mögliche neue Zusammenhänge geben (Abb. 11-14). Die einzelnen Abbildungen geben jeweils die relevanten Diagramme für die nukleären Rezeptoren FXR (Abb. 11), SHP (Abb. 12), PXR (Abb. 13) und CAR (Abb. 14) wieder.

Eine deutliche lineare Korrelation konnte beim nukleären Rezeptor FXR nur mit dem basolateralen Aufnahmemechanismus OATP2 (Abb. 11A) gefunden werden. Hier lag mit einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von $+0,597$ ein positiver linearer Zusammenhang vor (Anhang F, Tab. 14). Zwischen FXR und den hepatobiliären Transportern MRP2, MDR3

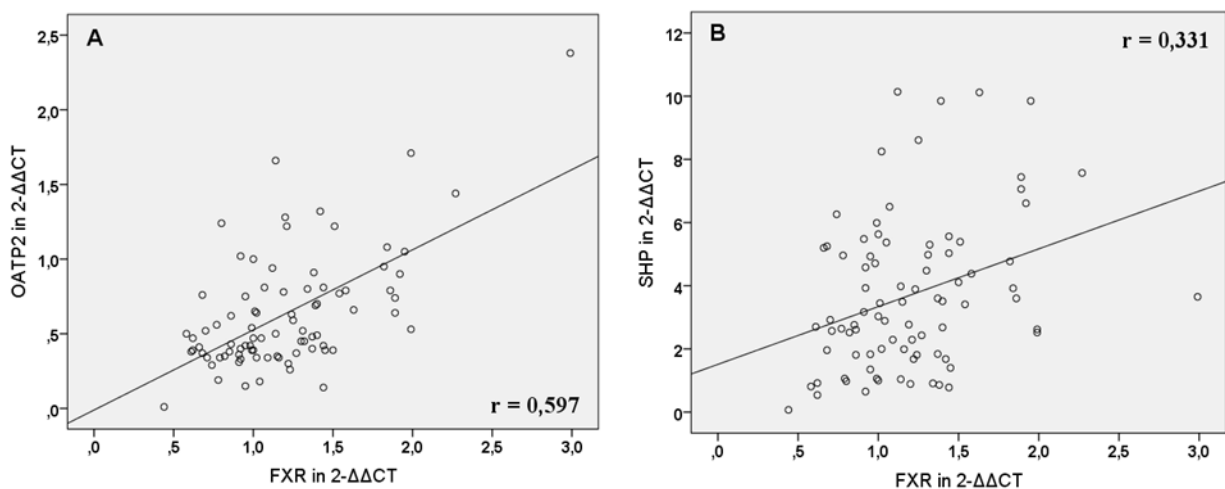


Abb. 11: Korrelation der Genexpression des nukleären Rezeptors FXR mit der Genexpression von OATP2 und SHP

r = Pearson-Korrelationskoeffizient, $n = 84$.

OATP = Organic-Anion-Transporting-Polypeptide, SHP = Small-Heterodimer-Partner, FXR = Farnesoid-X-Rezeptor.

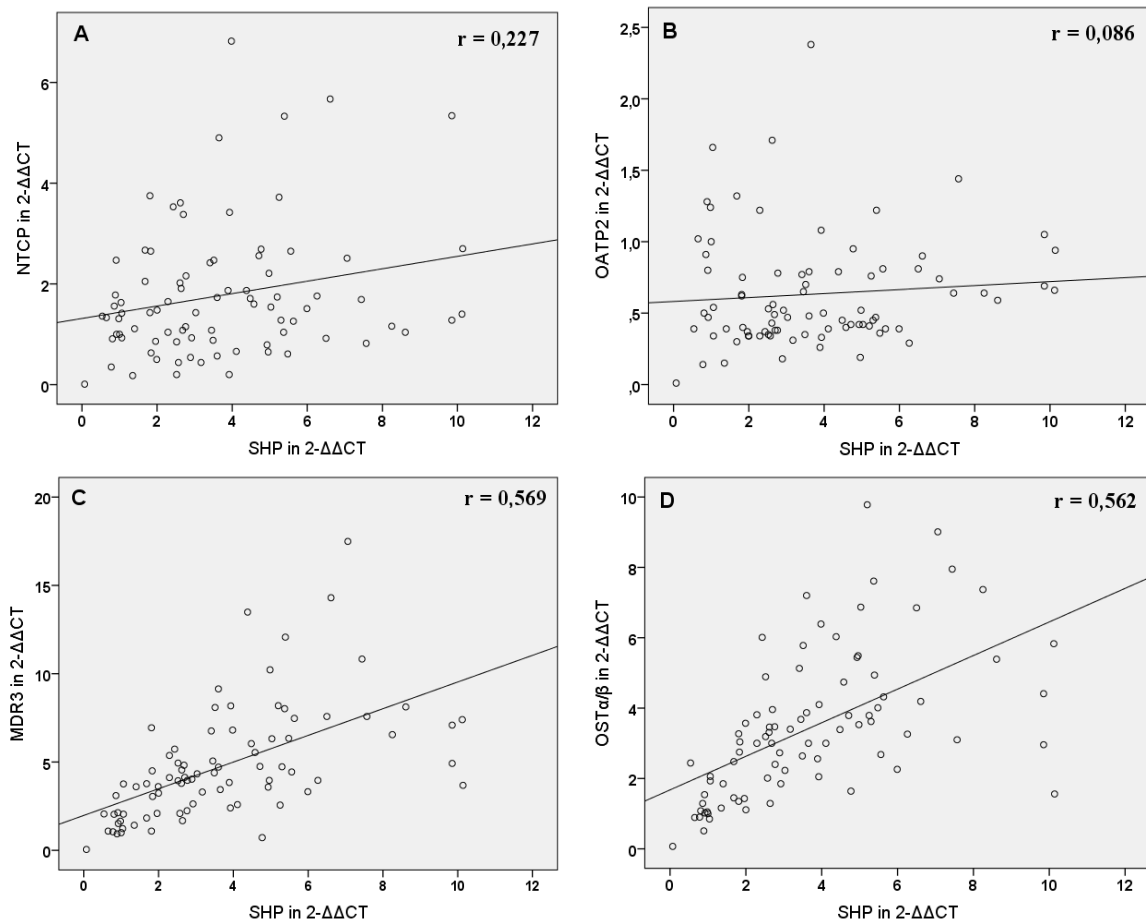


Abb. 12: Korrelation der Genexpression des nukleären Rezeptors SHP mit der Genexpression hepatobiliärer Transporter

r = Pearson-Korrelationskoeffizient, $n = 84$.

NTCP = Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide, OATP = Organic-Anion-Transporting-Polypeptide, MDR = Multiple-Drug-Resistance-Protein, OST = Organic-Solute-Transporter, SHP = Small-Heterodimer-Partner.

und MRP3, bei denen in der Literatur eine Regulation durch FXR beschrieben wurde, zeigten sich mit Werten zwischen +0,403 und +0,436 nur mäßig positive Korrelationen (5, 6, 7, 8, 27). Auch zwischen FXR und dem nukleären Rezeptor SHP fand sich mit $r = +0,331$ nur ein schwacher, positiv-linearer Zusammenhang (Abb. 11B).

SHP zeigte mit den Aufnahmemechanismen NTCP (Abb. 12A) und OATP2 (Abb. 12B), die durch SHP heruntergefahren werden sollen, keinen erkennbaren negativ-linearen Zusammenhang (5, 6, 9). SHP schien stattdessen vor allem mit Effluxmechanismen positiv zu korrelieren. Mit Pearson-Korrelationskoeffizienten von +0,569 und +0,543 konnte bei den kanalikulären Transportern MDR3 (Abb. 12C) und FIC1 ein positiver Zusammenhang gefunden werden, während auch die basolateralen Effluxpumpen MRP3 und OST α/β (Abb. 12D) mit Koeffizienten von +0,503 und +0,562 positive lineare Korrelationen aufwiesen.

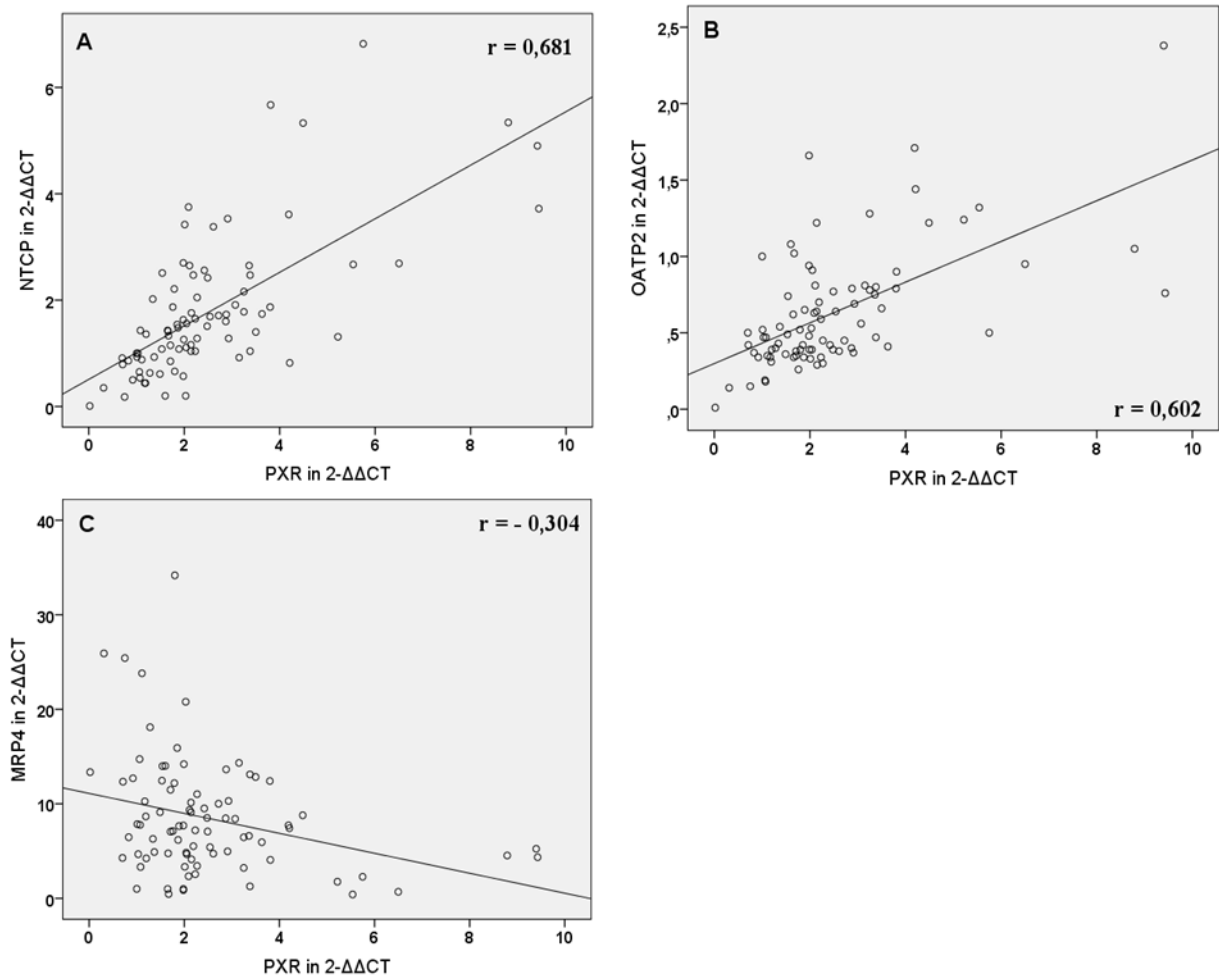


Abb. 13: Korrelation der Genexpression des nukleären Rezeptors PXR mit der Genexpression hepatobiliärer Transporter

r = Pearson-Korrelationskoeffizient, $n = 84$.

NTCP = Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide, OATP = Organic-Anion-Transporting-Polypeptide, MRP = Multidrug-Resistance-Related-Protein, PXR = Pregnane-X-Rezeptor.

Beim nukleären Rezeptor PXR zeigten sich mit Korrelationskoeffizienten von +0,681 und +0,602 deutlich positive lineare Zusammenhänge mit den Aufnahmemechanismen NTCP (Abb. 13A) und OATP2 (Abb. 13B). Mit anderen Effluxmechanismen, bei denen ein Zusammenhang bereits beschrieben wurde wie MRP2 ($r = +0,366$), MRP4 ($r = -0,304$, Abb. 13C) und MDR1 ($r = -0,184$) fanden sich nur schwach positive oder sogar schwach negative Korrelationen (5, 8, 9, 27, 35).

Auch der nukleäre Rezeptor CAR zeigte mit einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von +0,729 lediglich mit dem Transporter NTCP (Abb. 14A) einen deutlich positiven linearen Zusammenhang. Mit dem Transporter MRP2 konnte nur eine schwach positive Korrelation

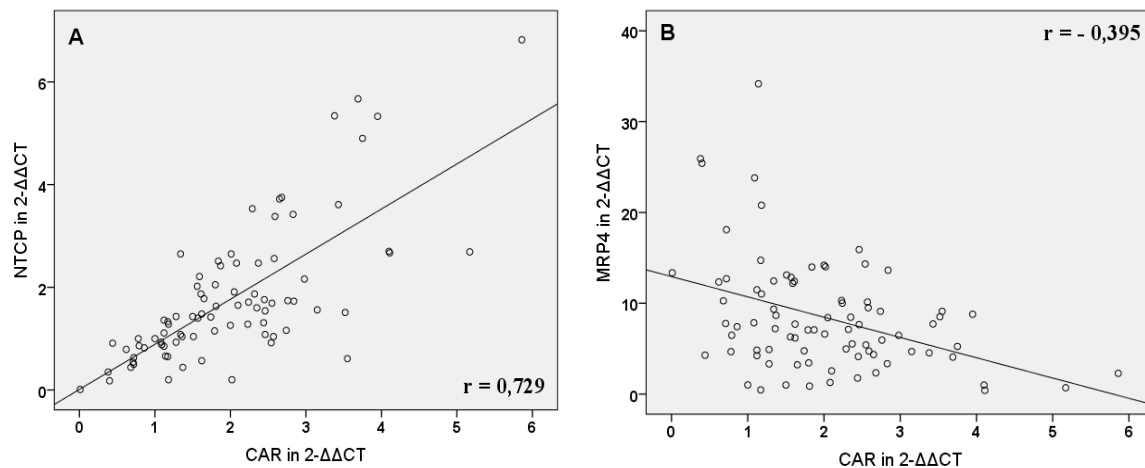


Abb. 14: Korrelation der Genexpression des nukleären Rezeptors CAR mit der Genexpression hepatobiliärer Transporter

r = Pearson-Korrelationskoeffizient, $n = 84$.

NTCP = Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide, MRP = Multidrug-Resistance-Related-Protein, CAR = Constitutive-Androstane-Rezeptor.

gefunden werden ($r = +0,282$). MRP3 und MRP4 (Abb. 14B) wiesen schwach negative Zusammenhänge mit CAR auf ($r = -0,026/-0,395$).

4.4. Korrelation von laborchemischen, histopathologischen und klinischen Parametern mit der mRNA-Expression der hepatobiliären Transporter und nukleären Rezeptoren

4.4.1. Laborchemische Parameter

In diesem Kapitel wurde der lineare Zusammenhang zwischen den Blutwerten cholestatischer Parameter (Gesamt-Bilirubin, Gallensäuren-Glyko, Gallensäuren-Tauro und Gesamt-Gallensäuren) und der mRNA-Expression der hepatobiliären Transporter und nukleären Rezeptoren untersucht. Dazu wurden Labor- und Genexpressionswerte aller Kinder ($n = 84$), mit und ohne cholestatischer Erkrankung, analysiert. Die Fragestellung sollte dazu dienen, Erkenntnisse zur möglichen Regulation der einzelnen Transportsysteme durch anfallende cholestatische Produkte zu entwickeln. Hierbei wurde besonders darauf geachtet, ob ein Anstieg bestimmter cholestatischer Laborwerte einen dazu proportionalen Anstieg oder Abfall bestimmter Transporter oder nukleärer Rezeptoren aufwies. Anhang G, Tab. 15 zeigt eine Übersicht aller getesteten Datensätze durch Angabe des jeweiligen Pearson-Korrelationskoeffizienten. Von einer deutlich linearen Korrelation wird auch hier ab einem

Pearson-Korrelationskoeffizient von $\geq 0,5$ oder $\leq -0,5$ ausgegangen. Konstellationen, bei denen dies zutrifft, sind in der Tabelle dick umrandet. Von einer mäßigen linearen Korrelation wird ab einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von $\geq 0,4$ oder $\leq -0,4$ gesprochen. In den Abb. 15 und 16 sind Konstellationen abgebildet, bei denen bereits in der Literatur ein regulatorischer Zusammenhang beschrieben wurde, sowie Konstellationen, bei denen sich ein neuer, deutlich linearer Zusammenhang gezeigt hat.

Zwischen den cholestatischen Laborparametern und der Genexpression der nukleären Rezeptoren FXR, SHP, PXR, CAR konnten keine relevanten linearen Zusammenhänge gefunden werden (Anhang G, Tab. 15). Insbesondere bei FXR (Abb. 15A), der bekanntlich durch Gallensäuren induziert wird sowie bei CAR (Abb. 15B), der durch ansteigendes Bilirubin vermehrt induziert wird, zeigten sich keine deutlich positiven linearen Korrelationen mit den genannten Induktoren (6, 27). CAR und die Laborwerte für Bilirubin wiesen stattdessen sogar leicht negativ-lineare Zusammenhänge auf (Anhang G, Tab. 15).

Hinsichtlich der hepatobiliären Transporter wurde erwartet, dass apikale und basolaterale Effluxtransporter im Sinne einer Verstoffwechslung der anfallenden Cholestaseprodukte in einem positiven linearen Zusammenhang mit den Laborwerten für Bilirubin und den verschiedenen Gallensäurewerten stehen. Von den Aufnahmetransportern NTCP und OATP2 wurde im Sinne einer verminderten Aufnahme ein negativ-linearer Zusammenhang mit den Laborwerten für Bilirubin und Gallensäuren erwartet (6, 7, 9, 27).

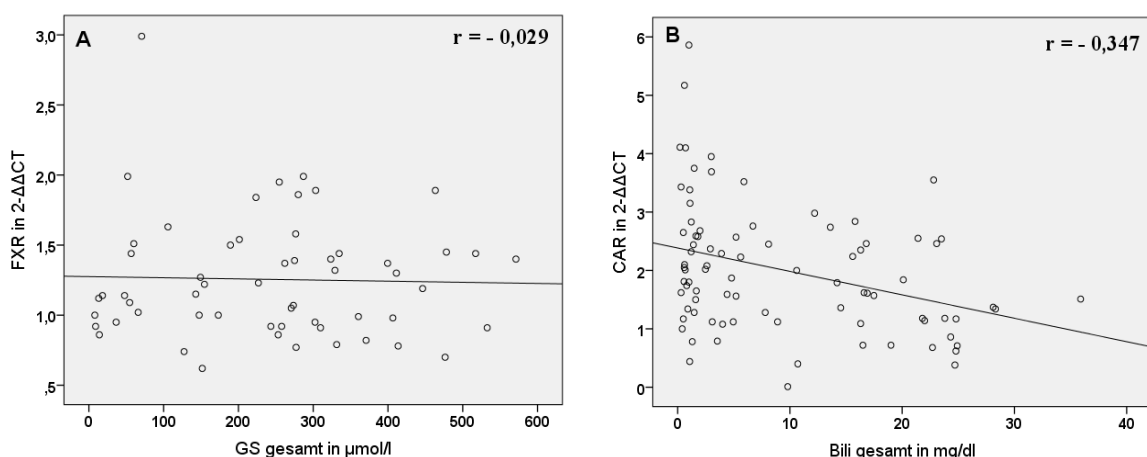


Abb. 15: Korrelation von cholestatischen Laborparametern mit der Genexpression der nukleären Rezeptoren FXR und CAR

r = Pearson-Korrelationskoeffizient, Abb. 15A: $n = 57$, Abb. 15B: $n = 84$.

FXR = Farnesoid-X-Rezeptor, CAR = Constitutive-Androstane-Rezeptor, GS = Gallensäuren, Bili = Bilirubin.

Der Aufnahme-Transporter NTCP zeigte mit Pearson-Korrelationskoeffizienten von -0,486 und -0,463 mäßige negative lineare Korrelationen mit den Blutwerten für Gesamt-Bilirubin, direktes Bilirubin und Taurocholate. OATP2 wies mit -0,443 und -0,410 mäßige negative Korrelationen mit Taurocholaten sowie mit den Gesamt-Gallensäuren auf (Anhang G, Tab. 15).

Bei den apikalen Effluxtransportern MRP2 und MDR3 konnten keine relevanten linearen Korrelationen mit einem der getesteten Blutwerte gefunden werden. MDR1 dagegen zeigte mit +0,643 und +0,538 deutliche positive lineare Zusammenhänge mit Gesamt-Bilirubin (Abb. 16A) und Taurocholaten. Die Effluxpumpen CFTR und OST α/β wiesen nur mäßige positive lineare Korrelationen mit den Werten für Gesamt-Bilirubin auf. FIC1 (Abb. 16B), MRP3 (Abb. 16C) und MRP4 (Abb. 16D) zeigten mit Koeffizienten von +0,560, +0,623 und

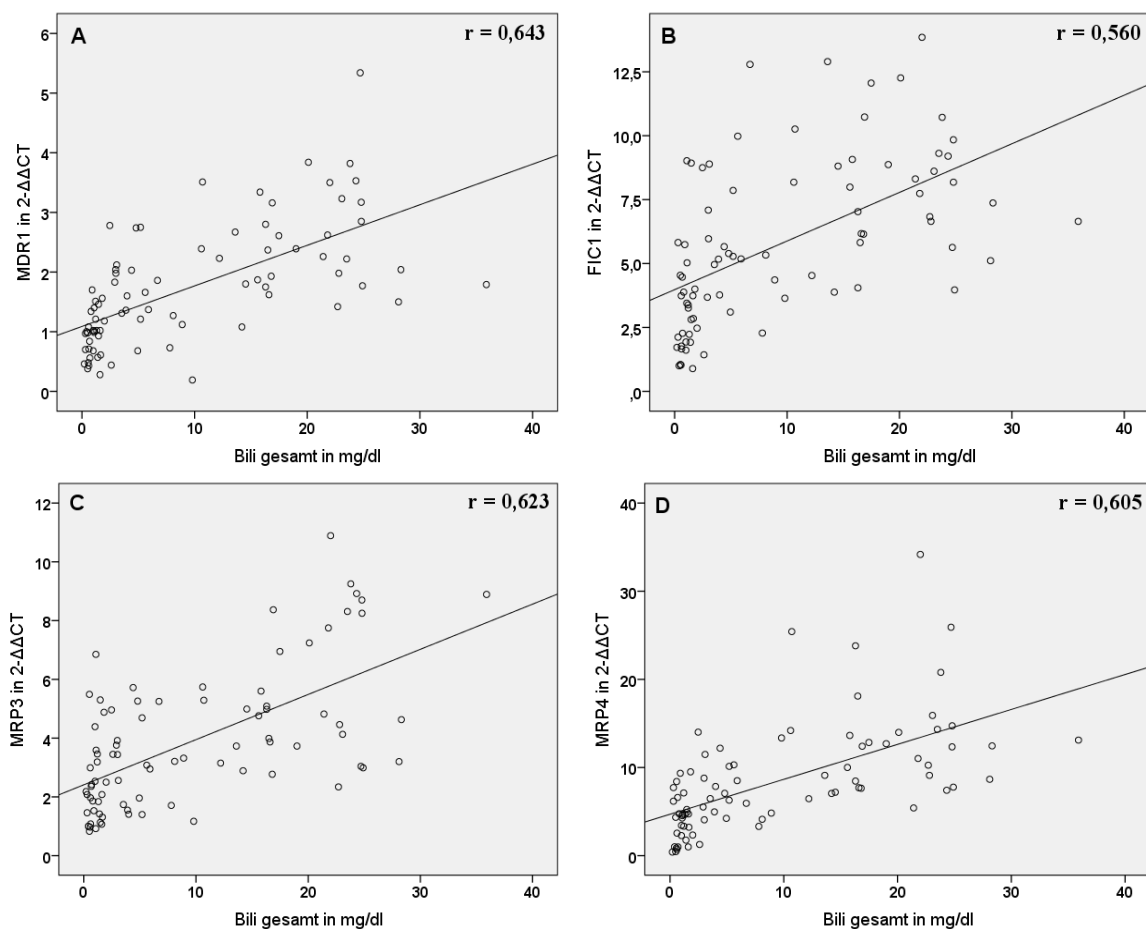


Abb. 16: Korrelation von Gesamt-Bilirubin mit der Genexpression hepatobiliärer Effluxtransporter

r = Pearson-Korrelationskoeffizient, $n = 84$.

MDR = Multiple-Drug-Resistance-Protein, FIC = Familiar-Intrahepatic-Cholestasis-Protein, MRP = Multidrug-Resistance-Related-Protein, Bili = Bilirubin.

+0,605 jedoch deutlich positive lineare Zusammenhänge mit dem Gesamt-Bilirubin. Bei FIC1, CFTR und MRP4 konnten zudem mäßige positive Korrelationen mit Taurocholaten gefunden werden (Anhang G, Tab. 15).

Insgesamt schien das Gesamt-Bilirubin vor allem mit den Effluxpumpen MDR1, FIC1, CFTR, MRP3, MRP4 und OST α/β in einer positiven linearen Beziehung zu stehen, während mit dem Aufnahmetransporter NTCP eine negative lineare Korrelation vorlag. Auch die Taurocholate schienen mit den Effluxpumpen MDR1, FIC1, CFTR und MRP4 positiv zu korrelieren, während mit den Aufnahmetransportern NTCP und OATP2 negative lineare Zusammenhänge gefunden werden konnten (Anhang G, Tab. 15).

4.4.2. Histologische Parameter

In diesem Kapitel wurde untersucht, ob verschiedene Schweregrade an Cholestase oder Inflammation mit unterschiedlichen Genexpressionen der hepatobiliären Transporter oder nukleären Rezeptoren einhergehen. Ziel war es, herauszufinden, ob bei histologisch stärker von der Krankheit geschädigtem Gewebe andere adaptive Mechanismen aktiv sind als bei milder betroffenem Gewebe. Zudem sollte die Frage geklärt werden, welche Rolle die Inflammation bei der Regulierung der adaptiven Mechanismen spielt. Hierfür wurden die Lebergewebeproben aller an Cholestase erkrankten Kinder anhand der Beurteilung im histopathologischen Befund in die Schweregrade „leichte/ mittelgradige/ schwere Cholestase“ eingeteilt. Als Vergleichsstadium „keine Cholestase“ dienten neun Gewebeproben, die histopathologisch keine Anzeichen einer Cholestase aufwiesen. Anschließend wurde mittels Mann-Whitney-U-Test getestet, ob sich die hepatobiliäre Genexpression in den Gewebeproben der verschiedenen Cholestase-Schweregrade jeweils von der Genexpression der Gruppe „keine Cholestase“ statistisch signifikant unterscheidet. Cholestatische sowie Vergleichsproben wurden außerdem anhand der histopathologischen Befunde in die vier Gruppen „keine/ leichte/ mittelgradige/ schwere Inflammation“ eingeteilt. Auch hier wurde anschließend mittels Mann-Whitney-U-Test untersucht, ob ein statistisch signifikanter Unterschied in der Genexpression hepatobiliärer Transporter und nukleärer Rezeptoren zwischen den Inflammationsstadien „leichte/ mittelgradige/ schwere Inflammation“ und dem Stadium „keine Inflammation“ gefunden werden kann. Anhang H, Tab. 16 enthält die Signifikanzwerte des Mann-Whitney-U-Tests bei verschiedenen Cholestase- oder Inflammationsgraden. Statistisch signifikante Werte sind durch eine dicke Umrandung gekennzeichnet. Die Tab. 9 und 10 fassen diese Ergebnisse bei den verschiedenen Schwere-

Tab. 9: Zusammenfassung der Genexpressionsunterschiede hepatobiliärer Transporter und nukleärer Rezeptoren bei verschiedenen Schweregraden an Cholestase

Cholestasegrad	NTCP	OATP2	MRP2	MDR1	MDR3	FIC1	CFTR
leicht (n = 7)	-	-	-	-	-	-	-
mittel (n = 3)	-	-	-	-	-	-	-
schwer (n = 40)	↓	↓	-	↑↑	↑	↑↑	↑↑
	MRP3	MRP4	OST α/β	FXR	SHP	PXR	CAR
leicht (n = 7)	-	-	-	-	-	-	-
mittel (n = 3)	-	-	-	-	-	-	-
schwer (n = 40)	↑↑	↑↑	↑↑	-	↑	-	-

↑/↓ = im Vergleich zum Stadium „keine Cholestase“ (n = 9) mit $p < 0,05$ vermehrt/ vermindert exprimiert,

↑↑/↓↓ = im Vergleich zum Stadium „keine Cholestase“ (n = 9) mit $p < 0,01$ vermehrt/ vermindert exprimiert.

NTCP = Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide, OATP = Organic-Anion-Transporting-Polypeptide, MRP = Multidrug-Resistance-Related-Protein, MDR = Multiple-Drug-Resistance-Protein, FIC = Familial-Intrahepatic-Cholestasis-Protein, CFTR = Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator, OST = Organic-Solute-Transporter, FXR = Farnesoid-X-Rezeptor, SHP = Small-Heterodimer-Partner, PXR = Pregnane-X-Rezeptor, CAR = Constitutive-Androstane-Rezeptor.

graden an Cholestase (Tab. 9) oder Inflammation (Tab. 10) zusammen. ↑ und ↓ zeigen dabei an, dass der Transporter oder nukleäre Rezeptor bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ im jeweiligen Stadium im Vergleich zum Stadium „keine Cholestase/ keine Inflammation“ vermehrt oder vermindert exprimiert vorlag. ↑↑ und ↓↓ kennzeichnen ein Signifikanzniveau von $p < 0,01$.

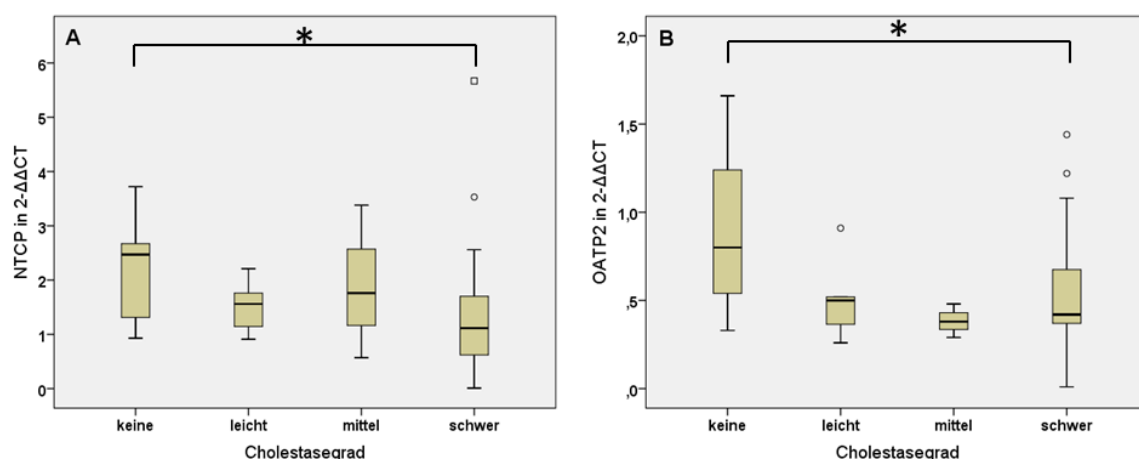


Abb. 17: Genexpression der basolateralen Aufnahmetransporter NTCP und OATP2 bei verschiedenen Schweregraden an Cholestase

* / ** = bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ / $p < 0,01$ im Vergleich zum Stadium „keine Cholestase“ (n = 9) signifikant unterschiedlich. Leichte Cholestase: n = 7, Mittelschwere Cholestase: n = 3, Schwere Cholestase: n = 40.

NTCP = Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide, OATP = Organic-Anion-Transporting-Polypeptide.

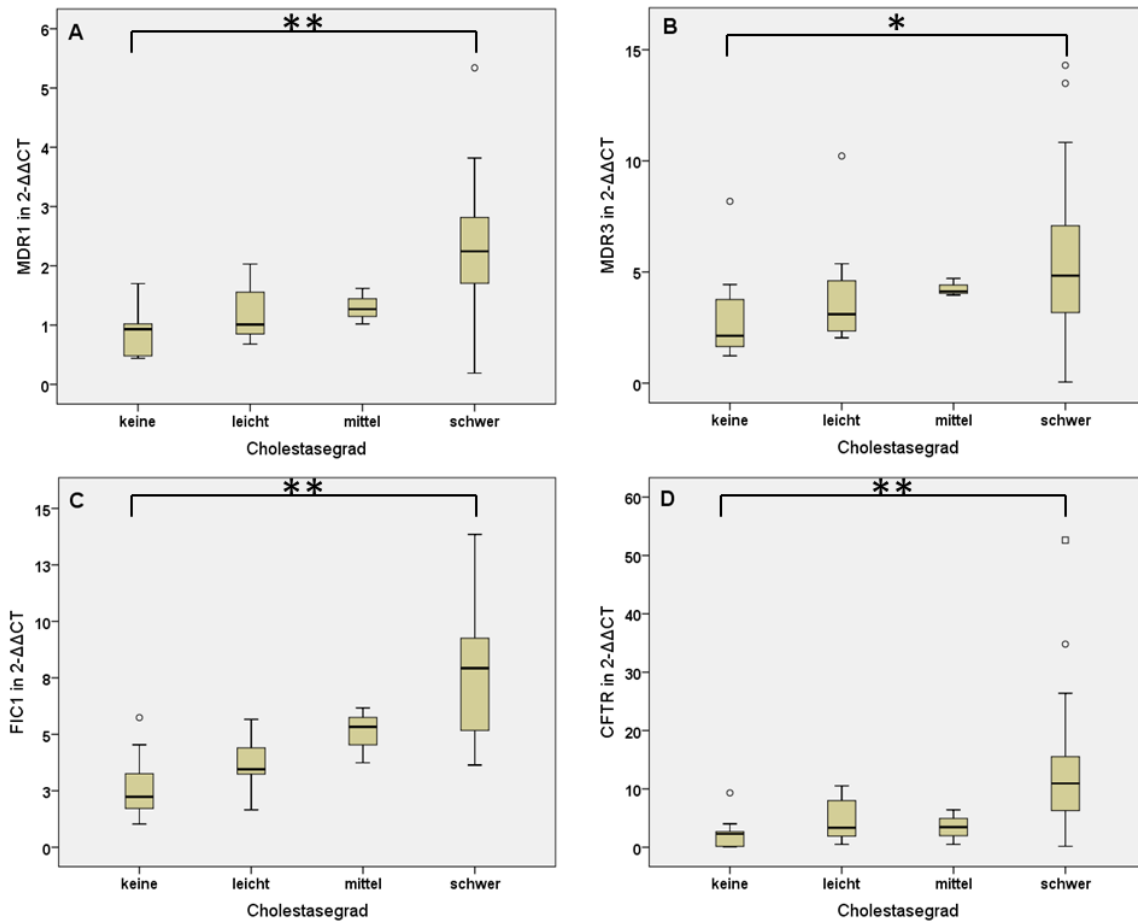


Abb. 18: Genexpression kanalikulärer Transporter und des Cholangiozytentransporters CFTR bei verschiedenen Schweregraden an Cholestase

*/ ** = bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ / $p < 0,01$ im Vergleich zum Stadium „keine Cholestase“ ($n = 9$) signifikant unterschiedlich. Leichte Cholestase: $n = 7$, Mittelschwere Cholestase: $n = 3$, Schwere Cholestase: $n = 40$.

MDR = Multiple-Drug-Resistance-Protein, FIC = Familial-Intrahepatic-Cholestasis-Protein, CFTR = Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator.

Die Abb. 17-19 zeigen die Genexpression der jeweiligen Transporter und nukleären Rezeptoren bei verschiedenen Cholestase-Schweregraden in Form von Boxplots. Die Abb. 20 und 21 zeigen die Genexpression bei verschiedenen Schweregraden an Inflammation. Im Vergleich zum Stadium „keine Cholestase/ Inflammation“ signifikant veränderte Genexpressionen wurden mit * für $p < 0,05$ und mit ** für $p < 0,01$ markiert.

Hinsichtlich des histologischen Parameters Cholestasegrad konnten statistisch signifikante Unterschiede in der Genexpression jeweils nur zwischen den Stadien „keine Cholestase“ und „schwere Cholestase“ gefunden werden (Tab. 9 und Anhang H, Tab. 16). Bei den beiden Aufnahmetransportern NTCP und OATP2 (Abb. 17A und 17B) zeigte sich die Genexpression im Stadium „schwere Cholestase“ im Vergleich zum Stadium „keine Cholestase“ statistisch

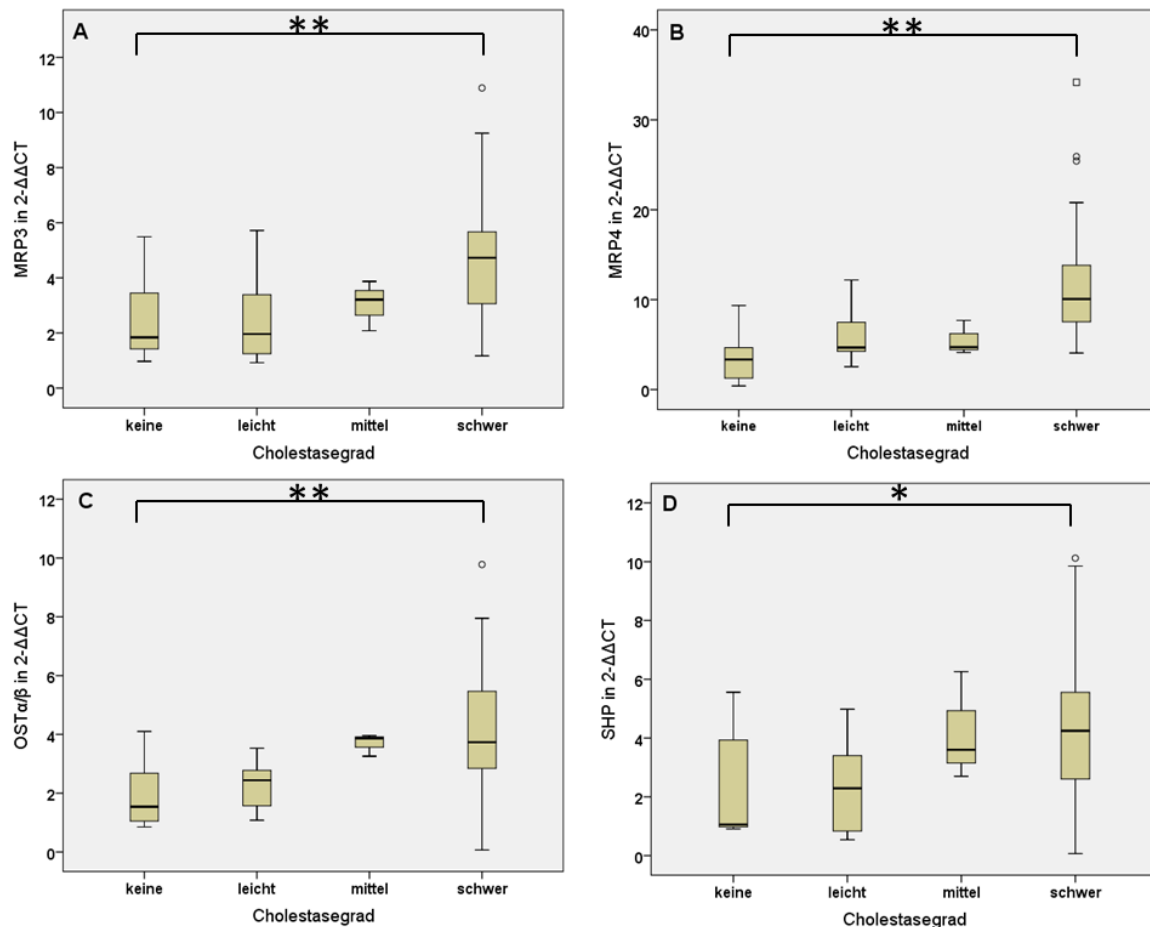


Abb. 19: Genexpression basolateraler Effluxtransporter und des nukleären Rezeptors SHP bei verschiedenen Schweregraden an Cholestase

*/ ** = bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ / $p < 0,01$ im Vergleich zum Stadium „keine Cholestase“ ($n = 9$) signifikant unterschiedlich. Leichte Cholestase: $n = 7$, Mittelschwere Cholestase: $n = 3$, Schwere Cholestase: $n = 40$.

MRP = Multidrug-Resistance-Related-Protein, OST = Organic-Solute-Transporter, SHP = Small-Heterodimer-Partner.

signifikant reduziert. Es fällt zudem auf, dass der OATP2-Transporter im Vergleich zum NTCP-Transporter bereits in den Stadien „leichte/ mittelgradige Cholestase“ anhand der Diagramme vermindert exprimiert wirkte, wenn auch nicht statistisch signifikant. Die kanalikulären Effluxpumpen MDR1 (Abb. 18A), MDR3 (Abb. 18B), FIC1 (Abb. 18C), der Cholangiozytentransporter CFTR (Abb. 18D) sowie die basolateralen Effluxpumpen MRP3 (Abb. 19A), MRP4 (Abb. 19B) und OSTα/β (Abb. 19C) waren bei schwerer Cholestase dagegen in signifikant erhöhtem Maße exprimiert. Bei der Effluxpumpe MRP2 sowie bei den nukleären Rezeptoren FXR, PXR und CAR konnten keine signifikanten Genexpressionsunterschiede festgestellt werden (Tab. 9 und Anhang H, Tab. 16). Der nukleäre Rezeptor SHP wurde dagegen im Stadium „schwere Cholestase“ signifikant hochreguliert (Abb. 19D).

Tab. 10: Zusammenfassung der Genexpressionsunterschiede hepatobiliärer Transporter und nukleärer Rezeptoren bei verschiedenen Schweregraden an Inflammation

Inflamationsgrad	NTCP	OATP2	MRP2	MDR1	MDR3	FIC1	CFTR
leicht (n = 33)	-	-	-	↑↑	-	↑↑	↑
mittel (n = 6)	-	-	-	↑↑	↑↑	↑	-
schwer (n = 4)	-	-	-	↑	-	↑	-
	MRP3	MRP4	OST α/β	FXR	SHP	PXR	CAR
leicht (n = 33)	-	↑	-	-	-	-	-
mittel (n = 6)	-	-	-	-	-	-	-
schwer (n = 4)	-	↑	-	-	-	↓↓	↓

↑/↓ = im Vergleich zum Stadium „keine Inflammation“ (n = 11) mit p < 0,05 vermehrt/ vermindert exprimiert, ↑↑/↓↓ = im Vergleich zum Stadium „keine Inflammation“ (n = 11) mit p < 0,01 vermehrt/ vermindert exprimiert. Leichte Inflammation: n = 33, Mittelschwere Inflammation: n = 6, Schwere Inflammation: n = 4.

NTCP = Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide, OATP = Organic-Anion-Transporting-Polypeptide, MRP = Multidrug-Resistance-Related-Protein, MDR = Multiple-Drug-Resistance-Protein, FIC = Familial-Intrahepatic-Cholestasis-Protein, CFTR = Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator, OST = Organic-Solute-Transporter, FXR = Farnesoid-X-Rezeptor, SHP = Small-Heterodimer-Partner, PXR = Pregnane-X-Rezeptor, CAR = Constitutive-Androstane-Rezeptor.

Bei der Auswertung des histologischen Parameters „Inflamationsgrad“ konnten bei den Aufnahmetransportern NTCP und OATP2 keinerlei Genexpressionsunterschiede zwischen den verschiedenen Schweregraden der Inflammation und dem Stadium „keine Inflammation“ gefunden werden (Tab. 10 und Anhang H, Tab. 16). Ebenso wenig zeigten sich signifikante Expressionsunterschiede bei den Transportern MRP2, MRP3 und OST α/β sowie bei den nukleären Rezeptoren FXR und SHP. Die Effluxtransporter MDR1 (Abb. 20A) und FIC1 (Abb. 20C) waren in allen Stadien der Entzündung im Vergleich zum Stadium „keine Inflammation“ signifikant erhöht. Der Chloridkanal CFTR (Abb. 20D) schien bei leichtem, der MDR3-Transporter (Abb. 20B) nur bei mittlerem Entzündungsgrad vermehrt exprimiert zu sein. MRP4 (Abb. 21A) war sowohl bei leichter als auch bei schwerer Inflammation erhöht, die nukleären Rezeptoren PXR und CAR (Abb. 21B und 21C) zeigten sich bei schwerer Inflammation signifikant reduziert.

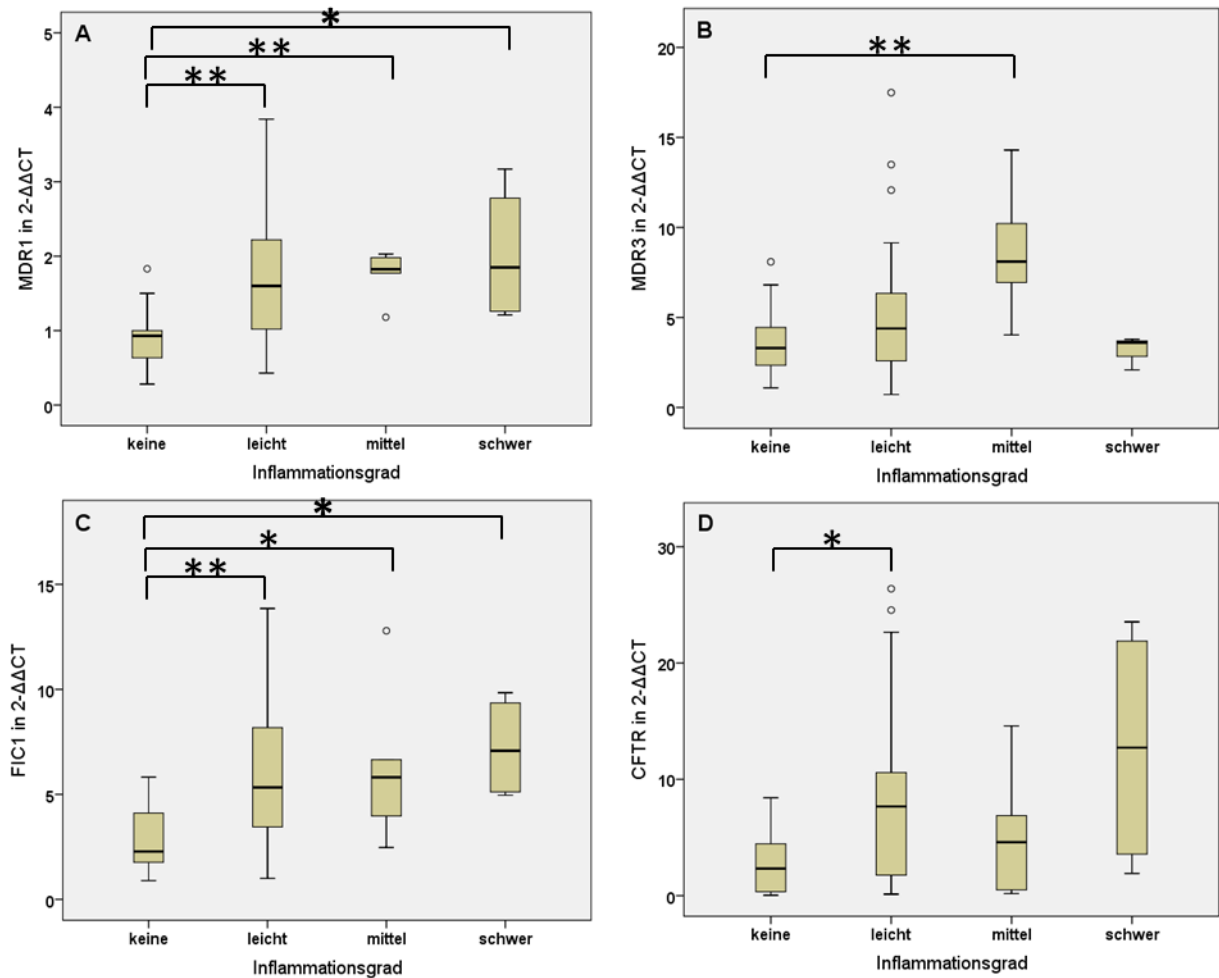


Abb. 20: Genexpression kanalikulärer Transporter und des Cholangiozytentransporters CFTR bei verschiedenen Schweregraden an Inflammation

*/ ** = bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ / $p < 0,01$ im Vergleich zum Stadium „keine Inflammation“ (n = 11) signifikant unterschiedlich. Leichte Inflammation: n = 33, Mittelschwere Inflammation: n = 6, Schwere Inflammation: n = 4.

MDR = Multiple-Drug-Resistance-Protein, FIC = Familial-Intrahepatic-Cholestasis-Protein, CFTR = Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator.

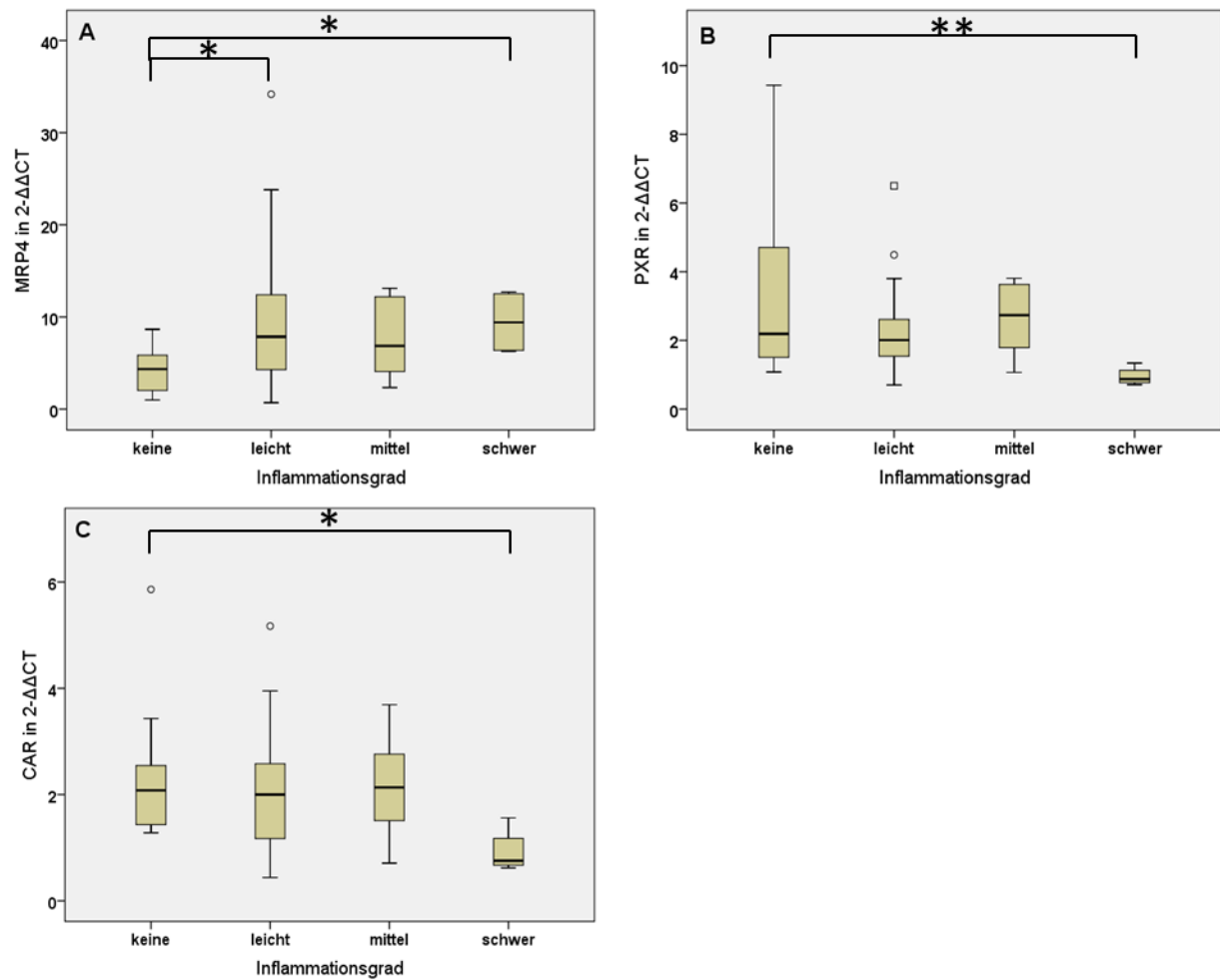


Abb. 21: Genexpression des basolateralen Transporters MRP4 und der nukleären Rezeptoren PXR und CAR bei verschiedenen Schweregraden an Inflammation

*/ ** = bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ / $p < 0,01$ im Vergleich zum Stadium „keine Inflammation“ ($n = 11$) signifikant unterschiedlich. Leichte Inflammation: $n = 33$, Mittelschwere Inflammation: $n = 6$, Schwere Inflammation: $n = 4$.

MRP = Multidrug-Resistance-Related-Protein, PXR = Pregnane-X-Rezeptor, CAR = Constitutive-Androstane-Rezeptor.

4.4.3. Klinische Parameter

Mittels der Fragebögen (Anhang B) an die Familien der betroffenen Kinder wurde erhoben, unter welchen cholestatischen Symptomen die Kinder litten und ob sie auf das jeweilige Antipruritus-Medikament angesprochen haben. In diesem Kapitel sollte nun untersucht werden, ob Kinder, die von dem jeweiligen cholestatischen Symptom verschont blieben, möglicherweise eine veränderte Expression eines hepatobiliären Transporters oder nukleären Rezeptors aufwiesen, die sich günstig auf das Krankheitsbild auswirkte.

Für die cholestatischen Symptome Hautikterus, Sklerenikterus, dunkler Urin, acholischer Stuhl und Juckreiz ergaben sich anhand der Fragebögen jeweils zwei Gruppen: eine Gruppe von Kindern, die an dem jeweiligen Symptom litt und eine Gruppe an Kindern, die nicht davon betroffen war. Bei der Frage, ob die Kinder auf die jeweilige Antipruritus-Medikation eine Besserung des Juckreizes verspürten, konnten drei Gruppen gebildet werden: Kinder, die darauf angesprochen haben bildeten die erste Gruppe. Kinder, die trotz Medikation fortwährend unter Juckreiz gelitten haben, bildeten die zweite Gruppe. Die dritte Gruppe enthielt Kinder, die das Symptom Juckreiz nicht aufwiesen und so folglich auch nicht auf das Medikament ansprechen konnten. Für die Fragestellung dieses Kapitels wurden nur die ersten beiden Gruppen verwendet und miteinander verglichen. Zur Untersuchung, ob signifikante Unterschiede in der Genexpression vorlagen, wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Dabei wurde immer die Gruppe an Kindern, die das jeweilige Symptom aufwies, mit der Gruppe an Kindern verglichen, die von dem Symptom verschont blieb. Anhang I, Tab. 17 gibt die jeweiligen Signifikanzniveaus als p-Werte für die verschiedenen cholestatischen Symptome wieder. Tabelle 11 fasst diese Ergebnisse zusammen. ↑ und ↓ zeigen dabei an, dass der jeweilige Transporter oder nukleäre Rezeptor bei Kindern, die das jeweilige Symptom aufwiesen, bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ vermehrt oder vermindert exprimiert vorlag. ↑↑ und ↓↓ kennzeichnen ein Signifikanzniveau von $p < 0,01$. Die Abb. 22-24 geben die signifikant veränderten Genexpressionen bei den cholestatischen Symptomen Hautikterus (Abb. 22), dunkler Urin und acholischer Stuhl (Abb. 23) und Juckreiz (Abb. 24) in Form von Boxplots wieder. Abbildung 25 zeigt signifikant veränderte Genexpressionen bei Kindern, die auf Antipruritus-Medikation ansprachen im Vergleich zu Non-Respondern. Eine Klammer mit Sternchen kennzeichnet im Boxplot das Signifikanzniveau: * steht für $p < 0,05$, ** steht für ein Signifikanzniveau von $p < 0,01$.

Tab. 11: Zusammenfassung der Genexpressionsunterschiede hepatobiliärer Transporter und nukleärer Rezeptoren bei Kindern mit/ohne cholestatischen Symptomen

Cholestat. Symptom (j/ n)	NTCP	OATP2	MRP2	MDR1	MDR3	FIC1	CFTR
Hautikterus (17/10)	-	↓	-	-	-	-	-
Sklerenikterus (22/5)	-	↓	-	-	-	-	-
Dunkler Urin (14/ 11)	-	↓	-	-	-	-	-
Acholischer Stuhl (22/4)	-	-	-	-	-	-	-
Juckreiz (14/13)	-	-	-	↓	-	↓↓	↓↓
Ansprechen auf Antipruritus-Medikation (4/10)	↓	-	-	-	-	-	-
	MRP3	MRP4	OST α / β	FXR	SHP	PXR	CAR
Hautikterus (17/10)	-	-	-	-	-	-	-
Sklerenikterus (22/5)	-	-	-	-	-	-	-
Dunkler Urin (14/11)	-	-	↑	↓	-	-	-
Acholischer Stuhl (22/4)	-	-	-	↓	-	-	-
Juckreiz (14/13)	-	↓	-	-	-	↑	-
Ansprechen auf Antipruritus-Medikation (4/10)	-	-	-	-	-	-	↓

↑/↓ = im Vergleich zu Kindern ohne das entsprechende cholestatische Symptom /ohne Ansprechen mit $p < 0,05$ vermehrt/ vermindert exprimiert, ↑↑/↓↓ = im Vergleich zu Kindern ohne das entsprechende cholestatische Symptom /ohne Ansprechen mit $p < 0,01$ vermehrt/ vermindert exprimiert. Die Zahlen in Klammern geben Vorliegen des jew. cholestatischen Symptoms/ Ansprechen im Sinne von (ja/ nein) als Anzahl n wieder.

j = ja, n = nein, NTCP = Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide, OATP = Organic-Anion-Transporting-Polypeptide, MRP = Multidrug-Resistance-Related-Protein, MDR = Multiple-Drug-Resistance-Protein, FIC = Familial-Intrahepatic-Cholestasis-Protein, CFTR = Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator, OST = Organic-Solute-Transporter, FXR = Farnesoid-X-Rezeptor, SHP = Small-Heterodimer-Partner, PXR = Pregnane-X-Rezeptor, CAR = Constitutive-Androstane-Rezeptor.

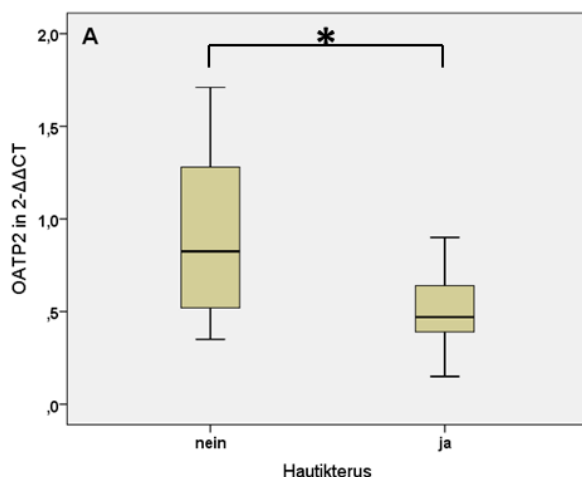


Abb. 22: Genexpression des Aufnahmetransporters OATP2 bei Kindern mit/ohne Hautikterus
*/ ** = bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ / $p < 0,01$ im Vergleich zu Kindern ohne Hautikterus (n = 10) signifikant unterschiedlich. Hautikterus nein: n = 10, ja: n = 17.
OATP = Organic-Anion-Transporting-Polypeptide.

Kinder, die an Haut- und Sklerenikterus litten, wiesen signifikant verminderte OATP2-Level (Abb. 22) auf gegenüber Kindern, die keinen Ikterus hatten. Die restlichen Transporter und nukleären Rezeptoren waren bei diesen beiden Symptomen unverändert exprimiert (Tab. 11 und Anhang I, Tab. 17). Auch Kinder mit dunklem Urin zeigten eine signifikant verminderte Expression von OATP2 (Abb. 23A). Zudem war bei Kindern mit dunklem Urin der Transporter OST α/β (Abb. 23B) signifikant erhöht. FXR war bei Kindern, die an dunklem Urin und an acholischem Stuhl litten, gleichermaßen signifikant vermindert (Abb. 23C und 23D).

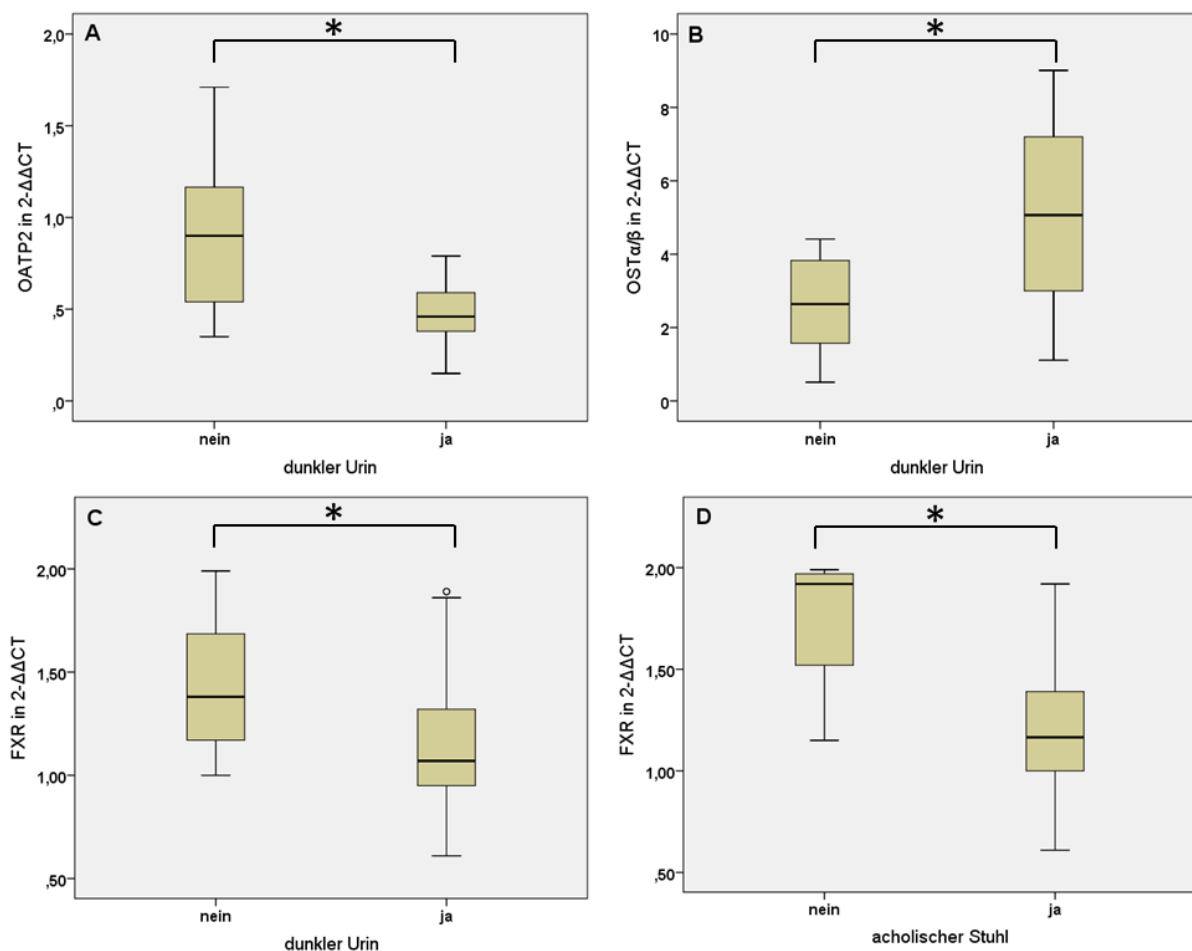


Abb. 23: Genexpression hepatobiliärer Transporter und nukleärer Rezeptoren bei Kindern mit/ ohne dunklem Urin oder acholischem Stuhl

*/ ** = bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ / $p < 0,01$ im Vergleich zu Kindern ohne dunklen Urin/ acholischen Stuhl ($n = 11$ / $n = 4$) signifikant unterschiedlich. Dunkler Urin nein: $n = 11$, ja: $n = 14$. Acholischer Stuhl nein: $n = 4$, ja: $n = 22$.

OATP = Organic-Anion-Transporting-Polypeptide, OST = Organic-Solute-Transporter, FXR = Farnesoid-X-Rezeptor.

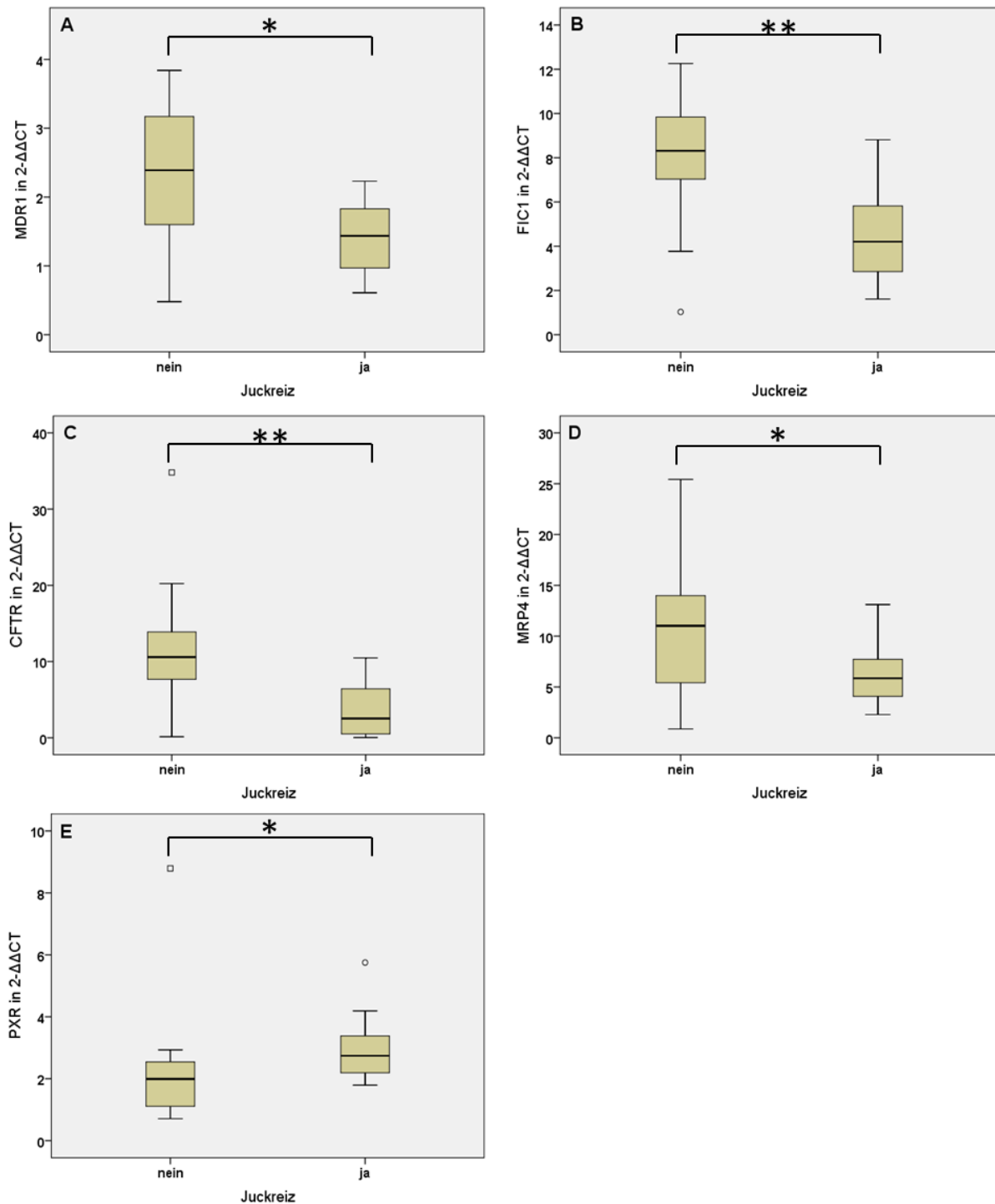


Abb. 24: Genexpression hepatobiliärer Transporter und nukleärer Rezeptoren bei Kindern mit/ ohne Juckreiz

*/ ** = bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ / $p < 0,01$ im Vergleich zu Kindern ohne Juckreiz ($n = 13$) signifikant unterschiedlich. Juckreiz nein: $n = 13$, ja: $n = 14$.

MDR = Multiple-Drug-Resistance-Protein, FIC = Familial-Intrahepatic-Cholestasis-Protein, CFTR = Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator, MRP = Multidrug-Resistance-Related-Protein, PXR = Pregnane-X-Rezeptor.

Bei Kindern, die an Juckreiz litten, fanden sich reduzierte Genexpressionen der Effluxtransporter MDR1 (Abb. 24A), FIC1 (Abb. 24B), CFTR (Abb. 24C) und MRP4 (Abb. 24D) und erhöhte Expressionen von PXR (Abb. 24E). Kinder, die auf die Antipruritus-Medikation angesprochen haben, wiesen gegenüber Non-Respondern signifikant reduzierte Genexpressionswerte des Aufnahmetransporters NTCP (Abb. 25A) und des nukleären Rezeptors CAR (Abb. 25B) auf. Die restlichen Transportsysteme und nukleären Rezeptoren waren unverändert exprimiert (Tab. 11 und Anhang I, Tab. 17).

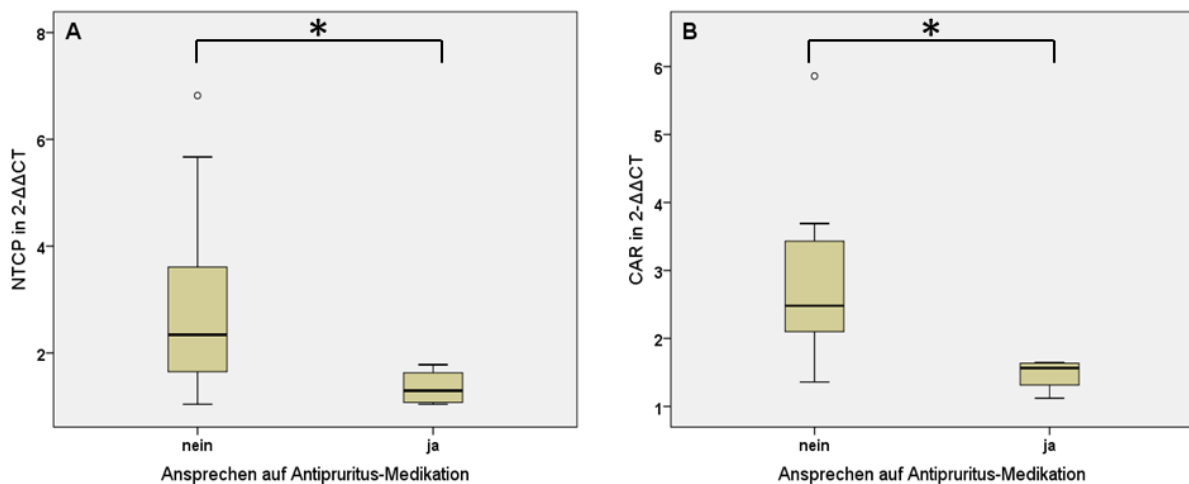


Abb. 25: Genexpression von NTCP und CAR bei Kindern mit/ ohne Ansprechen auf die Antipruritus-Medikation

*/ ** = bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ / $p < 0,01$ im Vergleich zu Kindern, die nicht auf Antipruritus-Medikation ($n = 10$) ansprechen signifikant unterschiedlich. Ansprechen nein: $n = 10$, ja: $n = 4$. NTCP = Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide, CAR = Constitutive-Androstane-Rezeptor.

4.5. Einfluss herkömmlicher Antipruritus-Medikamente auf die mRNA-Expression der hepatobiliären Transporter und nukleären Rezeptoren

Zur Untersuchung der Auswirkungen der gängigen Antipruritus-Medikamente UDCA, PB und RMP auf die mRNA-Expression der hepatobiliären Transporter und nukleären Rezeptoren wurden die an Cholestase erkrankten Kinder anhand ihrer Medikamenteneinnahme in fünf Gruppen eingeteilt. Während die Vergleichsgruppe ($n = 6$) kein derartiges Medikament erhielt, nahmen die restlichen Gruppen entweder nur UDCA ($n = 62$), UDCA mit wahlweise PB ($n = 3$) oder RMP ($n = 3$) oder alle drei Antipruritus-Medikamente ein ($n = 1$). Es sollte mittels Mann-Whitney-U-Test geprüft werden, ob bei Kindern, die UDCA einnahmen, eine signifikante Veränderung der Genexpression festgestellt

werden kann im Vergleich zu Kindern ohne Medikamenteneinnahme. Die restlichen Gruppen dienten dazu, festzustellen, ob die Einnahme zusätzlicher Antipruritus-Medikamente wie PB und RMP einen gleichsinnigen oder verstärkten Einfluss auf die Genexpression hepatobiliärer Transporter oder nukleärer Rezeptoren hat. Auch hier wurde getestet, ob ein signifikanter Genexpressionsunterschied im Vergleich zu den Kindern, die kein Medikament einnahmen, beobachtet werden kann.

Es ist bereits bekannt, dass UDCA, PB und RMP Liganden für die nukleären Rezeptoren FXR, SHP, PXR und CAR darstellen, die daraufhin eine vermehrte Genexpression der Aufnahme- und Effluxtransporter initiieren (6, 8, 9, 27, 33, 35). Die Abb. 26A-D zeigen deshalb die Genexpression dieser nukleären Rezeptoren für die oben genannten Medikamentengruppierungen, während Abb. 26E die Genexpression für CFTR zeigt. Die Boxplotdiagramme für die restlichen hepatobiliären Transporter werden im Anhang J, Abb. 27A-I gezeigt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe „kein Medikament“ signifikant veränderte Genexpressionen sind durch eine Klammer mit * für ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ gekennzeichnet. Tabelle 12 fasst diese Genexpressionsunterschiede zusammen. ↑ und ↓ zeigen dabei an, dass der jeweilige Transporter oder nukleäre Rezeptor bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe vermehrt oder vermindert exprimiert vorlag.

Hinsichtlich der nukleären Rezeptoren konnte kein signifikanter Genexpressionsunterschied zwischen Kindern, die Antipruritus-Medikamente einnahmen, und Kindern, die kein Medikament erhielten, festgestellt werden. FXR zeigte sich in allen Gruppierungen auf etwa dem gleichen Expressionslevel (Abb. 26A). SHP wirkte bei Kindern, die UDCA+PB+RMP einnahmen, reduziert (Abb. 26B), jedoch ohne statistische Signifikanz (Tab. 12 und Anhang K, Tab. 18). PXR schien in der Gruppierung „UDCA+RMP“ (Abb. 26C), CAR in den Gruppierungen „UDCA+RMP“ und „UDCA+PB+RMP“ (Abb. 26D) eine erhöhte Genexpression aufzuweisen. Auch hier konnte dies statistisch nicht bestätigt werden (Tab. 12 und Anhang K, Tab. 18).

Sowohl bei den Aufnahmetransportern als auch bei kanalikulären und basolateralen Effluxmechanismen konnten bis auf den Cholangiozytentransporter CFTR keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Genexpression bei den verschiedenen Medikamentengruppen festgestellt werden (Anhang J, Abb. 27A-I sowie Tab. 12 und Anhang K, Tab. 18). Während sowohl OATP2 (Anhang J, Abb. 27B) als auch MRP2 (Anhang J, Abb.

27C) bei Kindern, die UDCA+PB+RMP einnahmen, erhöht schienen, wirkte OST α/β (Anhang J, Abb. I) in der Gruppe “UDCA+RMP“ erhöht, jeweils ohne statistische Signifikanz. Abbildung 26E zeigt die Genexpression von CFTR bei verschiedenen Antipruritus-Medikamentengruppen. Es konnte eine statistisch signifikante Reduktion des CFTR-Transporters im Vergleich zur Kontrollgruppe bei Kindern festgestellt werden, die UDCA+PB oder UDCA+RMP einnahmen.

Tab. 12: Zusammenfassung der Genexpressionsunterschiede hepatobiliärer Transporter und nukleärer Rezeptoren bei Kindern mit unterschiedlicher Antipruritus-Medikation

Antipruritus-Medikation	NTCP	OATP2	MRP2	MDR1	MDR3	FIC1	CFTR
UDCA (n = 62)	-	-	-	-	-	-	-
UDCA + PB (n = 3)	-	-	-	-	-	-	↓
UDCA + RMP (n = 3)	-	-	-	-	-	-	↓
UDCA + PB + RMP (n = 1)	-	-	-	-	-	-	-
	MRP3	MRP4	OST α/β	FXR	SHP	PXR	CAR
UDCA (n = 62)	-	-	-	-	-	-	-
UDCA + PB (n = 3)	-	-	-	-	-	-	-
UDCA + RMP (n = 3)	-	-	-	-	-	-	-
UDCA + PB + RMP (n = 1)	-	-	-	-	-	-	-

↑/↓ = im Vergleich zur Gruppe „kein Medikament“ (n = 6) mit p < 0,05 vermehrt/ vermindert exprimiert,
 ↑↑/↓↓ = im Vergleich zur Gruppe „kein Medikament“ (n = 6) mit p < 0,01 vermehrt/ vermindert exprimiert
 NTCP = Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide, OATP = Organic-Anion-Transporting-Polypeptide,
 MRP = Multidrug-Resistance-Related-Protein, MDR = Multiple-Drug-Resistance-Protein, FIC = Familial-Intrahepatic-Cholestasis-Protein, CFTR = Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator, OST = Organic-Solute-Transporter, FXR = Farnesoid-X-Rezeptor, SHP = Small-Heterodimer-Partner, PXR = Pregnane-X-Rezeptor, CAR = Constitutive-Androstane-Rezeptor, UDCA = Ursodeoxycholsäure, PB = Phenobarbital, RMP = Rifampicin.

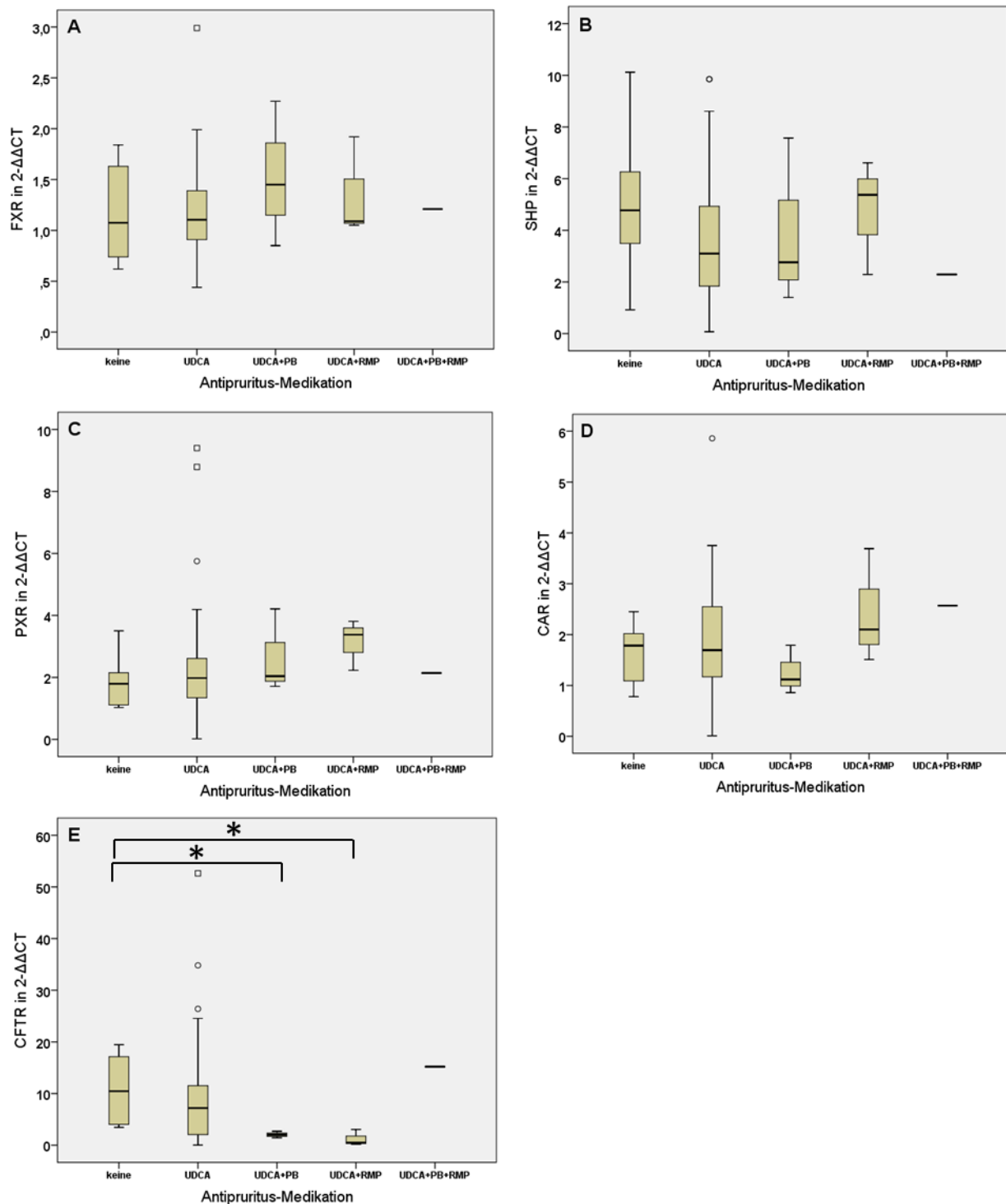


Abb. 26: Genexpression nukleärer Rezeptoren und des Cholangiozytentransporters CFTR bei Kindern mit unterschiedlicher Antipruritus-Medikation

*/ ** = bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ / $p < 0,01$ im Vergleich zur Gruppe „kein Medikament“ ($n = 6$) signifikant unterschiedlich. UDCA: $n = 62$, UDCA+PB: $n = 3$, UDCA+RMP: $n = 3$, UDCA+PB+RMP: $n = 1$. FXR = Farnesoid-X-Rezeptor, SHP = Small-Heterodimer-Partner, PXR = Pregnane-X-Rezeptor, CAR = Constitutive-Androstane-Rezeptor, CFTR = Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator, UDCA = Ursodeoxycholsäure, PB = Phenobarbital, RMP = Rifampicin.

5. Diskussion

5.1. Charakterisierung der Gewebeproben

Häufigkeit und Verteilung der cholestatischen Erkrankungen

Die Verteilung der cholestatischen Krankheiten macht deutlich, dass die BA mit $n = 56$ und 73% den Hauptteil der cholestatischen Erkrankungen in dieser Arbeit ausmacht. Verkade et al. nannten eine Inzidenz der BA von 1:10.000 - 1:19.000 in Europa und Nordamerika und wiesen darauf hin, dass Krankheiten wie ALGS und PFIC weit weniger häufig sind und die niedrige Inzidenz dieser Krankheiten ein Problem für die Erstellung patientenbasierter Studien darstellt (17). Hoerning et al. untersuchten eine Gruppe von 82 Kindern, die sich mit neonataler Cholestase im Zentrum Essen vorstellten. Sie nannten eine Inzidenz neonataler Cholestase von 1:2.500. In ihrer Studie konnten davon 41% der Fälle auf BA, 10% der Fälle auf PFIC und nur 2% der Fälle auf ALGS und 1% auf CF zurückgeführt werden (13). Jacquemin schätzte die Inzidenz von PFIC auf 1:50.000 - 1:100.000 (46). Die PFIC ist dadurch um ein Vielfaches seltener als das Krankheitsbild BA, was auch in dieser Arbeit mit einem Anteil der PFIC an allen cholestatischen Erkrankungen von 5% deutlich wurde. Hinsichtlich der CF beschrieben Scotet et al. für die Jahre 2005 - 2009 eine durchschnittliche Inzidenzrate von 1:3.500 Geburten in Europa (47). Auch wenn die CF damit prinzipiell eine höhere Inzidenz aufweist als die BA, lieferten Kobelska-Dubiel et al. eine Erklärung für die niedrigen Fallzahlen der CF in dieser Arbeit. Sie erklärten, dass sich eine CFLD, abhängig von der Schwere der Mutation des CFTR-Transporters, nur bei circa 30% der CF-Patienten entwickelt und dass auch bei diesen Patienten die Ausprägung der Leberbeteiligung stark variiert (21). Eine so starke Leberzellschädigung, die wie bei den Kindern dieser Arbeit eine Lebertransplantation zur Folge hat, kann deshalb nur bei einem Bruchteil der Patienten mit CFLD angenommen werden. Für das ALGS wird eine Inzidenz von 1:70.000, für das CS eine extrem niedrige Inzidenz von 1:1.000.000 angegeben (48, 49). All dies erklärt den großen Anteil der Kinder mit BA in dieser Arbeit und die niedrige Inzidenz der restlichen Krankheiten. Die Aussagekraft der statistischen Auswertung hinsichtlich ALGS und CS ist aufgrund der geringen Fallzahlen mit $n = 2$ (3%) und $n = 1$ (1%) sehr begrenzt und beschränkt sich auf einen Überblick über Tendenzen der veränderten Mechanismen.

Herkunft und Verwendbarkeit der Vergleichsproben

Auch wenn das Universitätsklinikum Regensburg ein Zentrum für pädiatrische Lebererkrankungen und Lebertransplantation darstellt, gestaltete es sich als schwierig, pädiatrische

Vergleichsproben zur Kontrolle zu gewinnen. Die Anzahl der Vergleichsproben beschränkte sich in dieser Arbeit daher auf $n = 7$. Da drei dieser Gewebeproben von Kindern mit Hepatoblastom stammen und die restlichen vier Gewebeproben bei Biopsien zum Ausschluss anderer Lebererkrankungen gewonnen wurden, repräsentiert die Gruppe der Vergleichsproben keine komplett gesunden Kinder. CRP und GPT waren in dieser Gruppe leicht erhöht, in der Histologie konnte bei zwei der fünf untersuchten Proben eine leichte Inflammation festgestellt werden. Zudem wiesen drei der sieben Kontrollen eine Splenomegalie auf. Da zwei Kinder davon an einem Hepatoblastom litten, stellt sich die Frage, ob Lebergewebe von Kindern mit Hepatoblastom als Vergleichsprobe geeignet ist. Es zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede zwischen cholestatischen Proben und Kontrollproben hinsichtlich Aszites und histologischem Vorhandensein von Zirrhose, Cholestase und Gallengangsproliferaten. Diese Parameter lagen, wie zu erwarten, bei fast allen cholestatischen Proben, nicht jedoch bei den Vergleichsproben vor. Auch im Labor erwiesen sich die Cholestaseparameter bei den Vergleichsproben als normwertig. Da in dieser Arbeit die adaptiven Mechanismen bei Cholestase untersucht wurden, konnten die Vergleichsproben deshalb inklusive der Proben von Kindern mit Hepatoblastom als Kontrolle verwendet werden. Chen et al. nutzten zur Untersuchung der Expression hepatobiliärer Transporter und nukleärer Rezeptoren bei BA als Normalgewebe ebenfalls das Gewebe von Kindern mit nicht-cholestatischen Lebererkrankungen. Dazu zählten auch bei Chen et al. Kinder mit Hepatoblastom (32).

Geschlechterverteilung

Die Geschlechterverteilung (m:w) fiel mit 46:38 etwas zu Gunsten der Jungen aus, was sich vor allem bei den Vergleichsproben mit 5:2, bei BA mit 30:26 und bei PFIC mit 3:1 zeigte. Bei Chen et al. lag bei den Kindern mit BA ebenfalls eine Geschlechterverteilung von 14:10 vor, die etwas zu Gunsten der Jungen ausfiel, auch wenn Chardot in ihrem Paper schrieb, dass BA bei Frauen etwas häufiger ist (16, 32). Bessho et al. beschrieben ebenfalls eine Geschlechterverteilung der BA von 1,25:1 zugunsten der Frauen (50). Hinsichtlich der PFIC gab Srivastava eine homogene Geschlechterverteilung an (23). Die Fallzahl zur PFIC ist mit $n = 4$ in dieser Arbeit zudem zu klein, um eine Aussage zur Geschlechterverteilung treffen zu können. Die Verteilung von 3:1 zugunsten der Jungen kann daher auch rein zufällig bedingt sein. Insgesamt zeigte sich in dieser Arbeit keine große Geschlechterdifferenz, weshalb ein Einfluss dieses Parameters vernachlässigt wurde.

Vergleichbarkeit hepatozellulärer Strukturen von Kindern und Erwachsenen

Kinder mit CS und BA erhielten ihren Eingriff im Durchschnitt mit 0,6 Jahren bzw. $1,8 \pm 3,3$ Jahren im Kleinkindalter, während Kinder mit ALGS, PFIC und die Kinder des cholestatischen Kollektivs etwas später, im Kindesalter, eine neue Leber erhielten. Die untersuchten Gewebeproben stammten damit größtenteils von sehr jungen Kindern und es stellt sich die Frage, ob diese deshalb mit den etwas reiferen Kindern der Vergleichsgruppe und mit Lebergewebeproben Erwachsener verglichen werden können. Chen et al. fanden in ihrer Arbeit über chronologische Veränderungen bei BA heraus, dass bereits Kinder < 1 Jahr eine reife kanalikuläre Struktur der Leber aufweisen und Vergleiche mit Erwachsenen daher hinsichtlich der hepatobiliären Transporter möglich sind (32).

Auftreten von Inflammation in den Gewebeproben

Bei den histologischen Parametern zeigte sich, dass viele Kinder mit cholestatischen Krankheiten sowie zwei Kinder des nicht-cholestatischen Vergleichskollektivs unter leichter bis mittelschwerer Inflammation der Leber litten. Vier Kinder mit BA wiesen zudem eine schwere Entzündung, acht Kinder keinerlei Anzeichen einer Entzündung auf. Es fiel somit eine große Heterogenität des Schweregrads an Inflammation auch innerhalb der einzelnen Krankheitsbilder auf, was die Vermutung nahelegt, dass Inflammation eine sekundäre und unspezifische Erscheinung bei Cholestase ist. Auch Bessho et al. konnten in Gewebeproben von Kindern mit BA variable Schweregrade an Inflammation feststellen. Sie stellten allerdings die Hypothese auf, dass proinflammatorische Zytokine bei BA eine Rolle in der Pathogenese der Erkrankung spielen, dass Inflammation vor allem im frühen Krankheitsstadium vorliegt und dass bei fortschreitender Erkrankung eine Progression zur Fibrose erfolgt (50). Bill et al. konnten in Leberbiopsien von zwölf Kindern mit BA in der Mehrzahl der Gewebeproben eine Infiltration durch Entzündungszellen sowohl innerhalb der Leber als auch in den extrahepatischen Gallengängen nachweisen. Auch sie äußerten die Hypothese eines progredienten Inflammationsprozesses als Auslöser der BA, der Leber und Gallengänge betrifft (51). Ob bei BA also inflammatorische Prozesse Ursache der Erkrankung oder Folge der Obstruktion sind, ist noch nicht vollständig geklärt. Bei den Krankheitsbildern CF und PFIC, bei denen die Ursache der Erkrankung durch den Nachweis von Genmutationen bereits bekannt ist, tritt die Inflammation wohl tatsächlich sekundär im Rahmen der Cholestase auf.

Erfassung und Ausprägung der cholestatischen Symptome

Hinsichtlich der Fragebögen an die Familien gab es einen positiven Rücklauf von $n = 27$, was 35% aller an Cholestase erkrankten Kinder dieser Arbeit widerspiegelt. Diese 27 Kinder stammten aus fünf verschiedenen cholestatischen Krankheitsgruppen (BA, CF, PFIC, ALGS und aus dem cholestatischen Kollektiv). Da zudem auch hinsichtlich der selteneren Krankheiten wie CF, PFIC und dem cholestatischen Kollektiv mit jeweils $n = 3$ und dem ALGS mit $n = 2$ verhältnismäßig viele Familien geantwortet haben, ermöglicht das Kap. 4.1.4. somit einen guten Überblick über die Ausprägung cholestatischer Symptome bei unterschiedlichen cholestatischen Erkrankungen. Fast alle Familien konnten sämtliche Fragen über das Vorhandensein der Symptome Hautikterus, Sklerenikterus, Juckreiz, dunkler Urin, acholischer Stuhl und über das Ansprechen ihres Kindes auf die Antipruritus-Medikation beantworten. Lediglich zwei Familien konnten keine Aussage darüber machen, ob ihr Kind dunklen Urin hatte. Eine Familie hat die Frage nach acholischem Stuhl nicht beantwortet. Vor allem die Symptome Haut- und Sklerenikterus sowie Juckreiz, zu denen alle Familien eine Aussage machen konnten, schienen daher recht eindrücklich gewesen und den Angehörigen im Gedächtnis geblieben zu sein. Rückblickend erwies sich deshalb die Befragung der Familien im Hinblick auf cholestatische Symptome als die richtige Methode.

Da 22 von 27 Kindern an Sklerenikterus litten und 22 von 26 Kindern an acholischem Stuhl, wird davon ausgegangen, dass diese beiden Symptome bei einer cholestatischen Erkrankung am häufigsten vorliegen. Auch Lai et al. stellten fest, dass 95% der Kinder mit BA in frühester Kindheit acholischen Stuhl aufwiesen (52). Feldman et al. zählten als typische Befunde einer Cholestase Haut- und Sklerenikterus, acholischen Stuhl und dunklen Urin auf (14). Eine Einlagerung von Bilirubin in die Haut erfolgt erst ab einem Bilirubin-Wert von 3-4mg/dl, während eine Einlagerung in die Skleren bereits ab 2,5mg/dl sichtbar ist (53). Dies erklärt, warum nur 17 Kinder an Hautikterus litten, jedoch 22 an Sklerenikterus. Dunkler Urin scheint insgesamt schwerer festzustellen zu sein als acholischer Stuhl. Da es infolge von Gallestau zu einer verminderten Abgabe von konjugiertem Bilirubin in den Darm/ Stuhl kommt und gleichzeitig zu einer vermehrten Ausscheidung des konjugierten Bilirubins mit dem Urin, wäre zu erwarten, dass acholische Stühle regelhaft mit dunklem Urin einhergehen (14). Da aber zwei Familien die Frage nach dunklem Urin nicht beantworten konnten und bei den restlichen 25 Kindern nur bei 14 dunkler Urin festgestellt wurde, könnte es sein, dass von den übrigen Familien auf dieses Symptom nicht geachtet wurde oder dass schlicht und einfach das Bewusstsein darüber fehlte, wie dunkler, cholestatischer Urin aussieht. Um cholestatische

Kindererkrankungen möglichst frühzeitig zu erkennen, sollte deshalb, eventuell im Rahmen der U3, bei allen Eltern neugeborener Kinder das Bewusstsein für die cholestatischen Symptome Sklerenikterus, acholischer Stuhl und dunkler Urin geschärft werden. Dies könnte durch Mitgabe von Stuhlfarbkarten (wie Kuno-Kids-Stuhlfarbkarte, Anhang D) oder Urinfarbkarten erreicht werden. Crofts et al. führten 1999 in Sheffield, UK, eine Studie durch, bei der die Durchführbarkeit von Stuhlfarbkarten bei Eltern neugeborener Kinder getestet wurde. Hierbei zeigte sich, dass keiner der Eltern vorher von der Bedeutung entfärbter Stühle für cholestatische Lebererkrankungen gewusst hatte, dass die Zuordnung der Stuhlfarbe auf der Karte aber keine Schwierigkeiten bereitete. Im Gegensatz dazu gestaltete sich die Beobachtung der Urinfarbe als schwierig und wurde deshalb vernachlässigt (54). Chen et al. untersuchten in den Jahren 2002/ 2003 in Taiwan den Nutzen von Stuhlfarbkarten bei der Diagnostik einer BA und fanden heraus, dass Stuhlfarbkarten eine kostengünstige und effektive Methode sind, um Cholestase im Rahmen einer BA in einem frühen Krankheitsstadium zu diagnostizieren (55).

Das Symptom Juckreiz war zwar mit 14 von 27 Kindern bei vielen Kindern vorhanden, 13 von 27 Kindern litten jedoch nicht darunter. Deshalb stellt Juckreiz bei den Kindern dieser Arbeit kein verlässliches Symptom der Cholestase dar. Es fällt zudem auf, dass vor allem Kinder mit BA häufig (zehn von 16) nicht unter Juckreiz litten, obwohl sie laborchemisch signifikant erhöhte Gallensäurewerte aufwiesen (Kap. 4.1.3.). Bessho erklärte dazu, dass Juckreiz bei BA vom Stadium der cholestatischen Erkrankung abhängt und auch Pusch et al. beschrieben, dass Juckreiz im Spätstadium einer cholestatischen Lebererkrankung trotz steigender Gallensäurespiegel oft nachlässt (22, 50). Da die Kinder dieser Arbeit alle an einem solchen Spätstadium der Lebererkrankung litten, liefert dies eine mögliche Erklärung für die niedrige Anzahl an Kindern mit Juckreiz. Eine weitere Erklärung dafür könnte sein, dass fast alle Kinder mit cholestatischen Erkrankungen Antipruritus-Medikamente erhalten haben. Genaue Daten zu Beginn dieser Medikation sind den Arztbriefen nicht zu entnehmen. Möglicherweise konnte ein früher Beginn der Antipruritus-Medikation einer Entwicklung von Juckreiz bei diesen Kindern entgegenwirken. Es bleibt daher ebenfalls fraglich, ob wirklich nur vier von 14 Kindern auf die Antipruritus-Medikation angesprochen haben oder ob eventuell einige Kinder, die in dieser Arbeit in die Kategorie „kein Juckreiz“ fielen, diesen Umstand einem frühen Beginn mit Antipruritus-Medikation zu verdanken haben. Eine andere Erklärung für das Fehlen von Juckreiz bei vielen Kindern mit BA könnte sein, dass, wie in Kap. 4.1.1. dargestellt, der Krankheitsbeginn für BA meist im ersten Lebensmonat oder

innerhalb des ersten Lebensjahres stattfand. Inwieweit so junge Kinder bereits Anzeichen von Juckreiz zeigen können, bleibt fraglich.

Ausprägung der Cholestase bei den verschiedenen cholestatischen Erkrankungen

Betrachtet man die Ergebnisse des Fragebogens und die Laborwerte, so kann man feststellen, dass es einige Unterschiede hinsichtlich der Ausprägung der Cholestase bei den verschiedenen cholestatischen Krankheitsbildern gibt. Da die Kinder mit CF laut Fragebogen kaum cholestatische Symptome hatten und auch die Cholestaseparameter im Labor nur leicht erhöht waren, schien die Retention gallepflichtiger Substanzen bei CF nicht so ausgeprägt zu sein wie bei anderen cholestatischen Krankheiten. Zwar präsentierten auch die Kinder mit CF erste cholestatische Symptome der Krankheit bereits im frühen Kindesalter, die Lebertransplantation war aber im Durchschnitt erst im Alter um die Pubertät nötig. Dies deutet auf einen milderen Verlauf der Cholestase bei CF hin. Der Pathomechanismus bei CF im Sinne eines Aufstaus viskösen Sekrets in den Gallengängen kann zwar, wie bei den Kindern dieser Arbeit, zu einer Inflammation der Leber mit Zellschaden, Zirrhosebildung und Syntheseminderung führen, auf der anderen Seite ist wohl trotzdem noch ein gewisser Abfluss der Galle gewährleistet. Auch Kobelska-Dubiel et al. beschrieben die CFLD als eine sich langsam, aber progressiv entwickelnde Krankheit, die kurz vor oder während der Jugend symptomatisch wird. Eine Cholestase bei Kindern ist selten (21). Im Gegensatz dazu liegen bei den Krankheitsbildern BA, ALGS und CS strukturelle Gallengangsanomalien vor, die wohl dauerhaft bereits im Kleinkindalter die Galledrainage behindern. Dies wird durch eine deutliche Erhöhung aller Cholestaseparameter im Labor bestätigt. Der schnellere und akutere Verlauf bei diesen Krankheitsbildern spiegelte sich vor allem bei BA und CS im jüngeren Alter bei Eingriff wider. So gilt BA als die am schnellsten progressive Cholangiopathie der Kindheit (50). Auch klinisch waren, laut Fragebogen, bei BA und ALGS sämtliche cholestatischen Symptome vorhanden, während zum Krankheitsbild CS leider kein Fragebogen vorlag. Die Kinder mit PFIC litten ebenfalls unter allen Anzeichen von Cholestase, sowohl laborchemisch als auch im Fragebogen. Da bei PFIC verschiedene Mutationen von Transportern vorliegen, die allesamt eine Rolle in der Sekretion gallepflichtiger Substanzen spielen, entwickelte sich der laborchemisch nachgewiesene Leberzellschaden auch hier wohl auf dem Boden einer primären Cholestase. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Kinder mit den Krankheiten BA, PFIC, ALGS und CS sehr deutlich von primärer Cholestase und ihren spezifischen Symptomen

betroffen waren, während die Kinder mit CF in erster Linie einen Leberzellschaden mit Syntheseminderung aufwiesen und einen milderen Verlauf der Cholestase zeigten.

Die Heterogenität der Krankheitsbilder im cholestatischen Kollektiv spiegelte sich in den Ergebnissen des Fragebogens sowie in Form von großen Standardabweichungen im Labor wider. Insgesamt kann aber auch hier festgehalten werden, dass bei vielen Kindern typische cholestatische Symptome vorlagen und auch die Cholestaseparameter im Labor insgesamt erhöht wirkten. Das cholestatische Kollektiv kann also zur Untersuchung der adaptiven Mechanismen bei Cholestase herangezogen werden.

5.2. Expression hepatobiliärer Transporter und nukleärer Rezeptoren in cholestatischen Gewebeproben und Vergleichsproben

In Kap. 4.2. wurden zehn klinisch relevante hepatobiliäre Transportmechanismen (NTCP, OATP2, MRP2, MDR1, MDR3, FIC1, CFTR, MRP3, MRP4 und OST α/β) und vier nukleäre Rezeptoren (FXR, SHP, PXR und CAR) hinsichtlich ihrer messenger-RNA (mRNA)-Expression untersucht. Deshalb konnten in dieser Arbeit nur Aussagen zur RNA-Expression, die vor jeglichen posttranskriptionellen Veränderungen vorlag, gemacht werden, während andere Autoren durch Durchführung von Western-Blots oder Immunhistochemie auch Aussagen über die Proteinexpression sowie histologisches Vorhandensein und Lokalisation der jeweils untersuchten Transporter und nukleären Rezeptoren machen konnten (28, 29, 30, 31, 32).

Aufgrund der bisherigen Studien zu Adaptionsmechanismen wurde erwartet, dass auch bei den cholestatischen Kinderproben dieser Arbeit gewisse Schutzmechanismen zur Erhaltung der Hepatozyten in Kraft getreten sind. Es wurde angenommen, dass die Aufnahmesysteme NTCP und OATP2 als Schutz vor Akkumulation von Gallensäuren und Bilirubin im Hepatozyten reduziert und sowohl kanalikuläre als auch basolaterale Effluxpumpen vermehrt exprimiert wurden (6, 7, 8, 27). Hinsichtlich der nukleären Rezeptoren wurde mit einer Aktivierung des FXR durch akkumulierende Gallensäuren und in dessen Folge auch mit einer Aktivierung von SHP gerechnet (7, 8). Auch von PXR und CAR wurde eine vermehrte Expression erwartet, da beide an der Aktivierung von Export- und Detoxifikationsmechanismen beteiligt sind und viele der Kinder bekannte Induktoren dieser nukleären Rezeptoren wie UDCA als Medikament einnahmen (8).

Basolaterale Aufnahmetransporter

Die mRNA des Aufnahmetransporters NTCP zeigte sich bei BA, wie erwartet, signifikant vermindert. Auch Trauner et al. und zahlreiche weitere Autoren beschrieben eine reduzierte Expression von NTCP bei Cholestase (6, 7, 8, 26). Zollner et al. untersuchten die Expression vieler Transporter in den fortgeschrittenen PBC-Stadien 3 und 4 und fanden erhöhte Spiegel an NTCP-mRNA bei PBC im Stadium 3, aber verminderte Proteinspiegel von NTCP bei PBC im Stadium 4. Dies deutet darauf hin, dass die verminderte Expression basolateraler Aufnahmetransporter womöglich erst in späteren Cholestasestadien, wie sie bei den cholestatischen Kinderkrankheiten vorlagen, stattfindet (30). Der OATP2-Transporter war sowohl bei BA als auch bei PFIC signifikant reduziert. Dies geht einher mit den Ergebnissen anderer Autoren, die über Adaptionsmechanismen bei Cholestase schrieben (6, 7, 8, 29). Keitel et al. untersuchten die Genexpression hepatobiliärer Transporter bei Kindern mit PFIC und fanden OATP2 ebenfalls in signifikant reduzierter Form vor (31). Beide Aufnahmetransporter wirkten bei den Krankheitsbildern ALGS und CS anhand der Grafiken vermindert, jedoch ohne statistische Signifikanz. Insgesamt scheinen die Aufnahmemechanismen NTCP und OATP2 bei Cholestase krankheitsübergreifend zurückgefahren zu werden, möglicherweise um die Hepatozyten vor weiterer Akkumulation toxischer Substanzen wie Bilirubin oder Gallensäuren zu schützen (7, 30, 36). Dies stimmt mit den Erwartungen überein.

Kanalikuläre Effluxtransporter

Der MRP2-Transporter lässt hinsichtlich seiner Regulation bei Cholestase keine eindeutigen Schlüsse zu. In dieser Arbeit zeigte er bei cholestatischen Gewebeproben keinen signifikanten Genexpressionsunterschied, wirkte jedoch bei BA vermindert. Zollner et al. beschrieben den MRP2-Transporter im PBC-Stadium 3 auf Protein-Level leicht erhöht, während andere Autoren MRP2 bei Cholestase in reduzierter Form vorfanden (7, 26, 28, 29, 30). Zollner fand keinen Unterschied in der MRP2-Expression auf mRNA-Niveau, während sich das MRP2-Protein im Western-Blot vermindert exprimiert zeigte, was auf eine erst posttranskriptionell stattfindende Reduktion des MRP2-Transporters hindeuten könnte (29).

Die kanalikulären Transporter MDR1 und MDR3 waren sowohl bei BA als auch bei PFIC signifikant vermehrt exprimiert und erschienen beide bei ALGS und CS erhöht. Zu einem solchen Ergebnis kam die Mehrheit der Autoren, die über Adaption bei Cholestase schrieben (26, 30, 31). Auch der Effluxmechanismus FIC1 und der Cholangiozytentransporter CFTR zeigten sich bei BA signifikant nach oben reguliert. Die kanalikulären Exportpumpen ent-

sprachen damit weitestgehend den Erwartungen, dass sie bei Cholestase zur Detoxifikation des Hepatozyten hochreguliert werden.

Bei CF erwies sich die mRNA-Expression des CFTR-Transporters überraschenderweise auf etwa dem gleichen Spiegel wie bei den Vergleichsproben. Xu et al. erklärten, dass es mehr als 800 verschiedene Mutationen des CFTR-Gens gibt, die zu den klinischen Symptomen der CF führen. Da die Schwere der Erkrankung sogar bei Vorliegen derselben Mutation sehr variabel ist, nahmen sie an, dass die Expression des CFTR-Transporters durch eine Vielzahl an Genen und Signalwegen beeinflusst wird und sowohl transkriptionell als auch posttranskriptionell reguliert wird (56). Die Kinder dieser Arbeit litten alle an einer fortgeschrittenen cholestatischen Erkrankung mit einer Vielzahl an pathologischen Prozessen der Leber, die alle potentiell eine Rolle in der Regulation des CFTR-Transporters spielen könnten. Es kann deshalb über die Ursache für die unveränderte Genexpression bei CF nur spekuliert werden.

Basolaterale Effluxtransporter

Von den basolateralen Effluxpumpen, die einen alternativen Weg für konjugierte Gallensäuren und Bilirubin ins Blut darstellen, wurde ebenfalls eine vermehrte Expression erwartet (6, 28). Der MRP3-Transporter zeigte auf mRNA-Ebene bei keiner der cholestatischen Kindererkrankung einen signifikanten Expressionsunterschied, ebenso wenig bei Keitel et al. und Zollner et al. (29, 31). Es wurden jedoch erhöhte Proteinspiegel des MRP3 bei PBC4 beschrieben, was ebenso wie beim MRP2-Transporter auf eine posttranskriptionelle Modifikation des MRP3-Transporters hinweisen könnte (30). MRP4 und OST α/β waren bei BA und PFIC signifikant vermehrt exprimiert. Gestützt wird dies von Zollner et al., die sämtliche basolaterale Effluxmechanismen nach Gallensäure-Fütterung als deutlich hochreguliert beschrieben (6). Auch Keitel et al. bemerkten eine Erhöhung des RNA- und Protein-Gehaltes von MRP4 bei PFIC (31). Denk fand das MRP4-Protein bei Ratten mit Gallengangsligatur in signifikant erhöhter Form vor (28). Insgesamt bestätigte sich die Erwartung, dass basolaterale Effluxpumpen bei Cholestase aktiviert werden vor allem bei MRP4 und OST α/β , während eine posttranskriptionelle Regulierung bei MRP3 sehr wahrscheinlich scheint.

Nukleäre Rezeptoren

Die nukleären Rezeptoren FXR und SHP erwiesen sich bei allen cholestatischen Erkrankungen im Vergleich zu den Kontrollproben als unverändert, obwohl eine Induktion von FXR durch akkumulierende Gallensäuren von zahlreichen Autoren beschrieben wurde (6,

7, 8, 27). PXR und CAR waren unerwarteterweise trotz ihrer wichtigen Rolle bei Detoxifikation und Elimination von Bilirubin und Gallensäuren bei BA signifikant vermindert (8).

Eine Erklärung für die von der Erwartung abweichenden Ergebnisse, besonders hinsichtlich MRP3 und der nukleären Rezeptoren, liefert die Arbeit von Chen et al. Die Autoren untersuchten den Adaptionsmechanismus bei chronisch-obstruktiver Cholestase bei Kindern mit frühem und spätem Stadium von BA. Als frühes Stadium galt Gewebe von acht Kindern, die die Kasai-OP erhielten, als spätes Stadium das Gewebe von acht Kindern während Lebertransplantation. Die Gruppe des späten Stadiums entspricht dem Patientenkollektiv dieser Arbeit, da sie ebenfalls an einem Endstadium einer cholestatischen Leberkrankheit litt und da die BA in dieser Arbeit die größte Krankheitsgruppe darstellte. Chen et al. fanden im späten Stadium der Cholestase dieselben Veränderungen, die im Kap. 4.2. dargestellt wurden: die Aufnahmetransporter NTCP und OATP2 waren signifikant vermindert, die Effluxpumpen MDR3, MDR1, OST α/β und MRP4 signifikant erhöht. MRP3 und die nukleären Rezeptoren FXR und SHP waren auch bei Chen et al. im späten Stadium unverändert exprimiert, während PXR signifikant vermindert war. Es fand also ein bidirektionaler Galletransport sowohl ins Blut als auch in die Gallengänge statt (32). Die einzigen Abweichungen zu dieser Arbeit stellten der MRP2-Transporter, den Chen et al. im späten Stadium signifikant reduziert fanden und der nukleäre Rezeptor CAR dar, der bei Chen et al. in unveränderter Form vorlag. Im frühen Stadium wurde die apikale Effluxpumpe MDR3 dagegen in reduzierter Form vorgefunden und auch der nukleäre Rezeptor FXR war vermindert exprimiert. Bei MDR1, MRP4 und PXR fand sich hier kein signifikanter Unterschied. Insgesamt konnten Chen et al. feststellen, dass im frühen Stadium der BA fast alle kanalikulären Transporter und basolateralen Aufnahmetransporter reduziert wurden, vermutlich um sowohl eine intrazelluläre Akkumulation toxischer Substanzen als auch einen erhöhten Galledruck in den verlegten Gallengängen zu vermindern (32). Vermittelt würde dies laut Chen et al. durch verminderte Spiegel an FXR, der viele Metabolisierungsenzyme und Transporter des Gallensäuremechanismus reguliert (8, 32). Chen et al. brachten außerdem die reduzierten Spiegel an PXR und CAR mit verschlechterter Detoxifikationsfähigkeit und Prognose in Verbindung (32). Auch bei den Kindern mit BA in dieser Arbeit lag somit wohl aufgrund von reduzierten PXR- und CAR-Spiegeln eine verminderte Detoxifikationsfähigkeit vor.

Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass bei cholestatischen Kindererkrankungen dieselben adaptiven Mechanismen in Kraft treten wie bei erwachsenen cholestatischen

Erkrankungen oder Tiermodellen: die Aufnahmetransporter NTCP und OATP2 werden heruntergefahren, um die Hepatozyten vor akkumulierenden toxischen Substanzen zu schützen (26, 28, 29, 30). Kanalikuläre Effluxmechanismen werden im frühen Stadium reduziert, vermutlich um die Gallengänge vor erhöhtem Galledruck zu schützen, im späten Stadium jedoch erhöht, um einen bidirektionalen Galletransport zu gewährleisten (32). Der MRP2-Transporter, der viele Medikamente und organische Anionen in die Galle transportiert, war in dieser Arbeit unverändert exprimiert, bei vielen Autoren jedoch reduziert (7, 26, 28, 29, 32). Auch hier könnte eine Reduktion des Transporters den Galledruck in den Gallengängen senken und sich somit positiv auf das cholestatische Krankheitsbild auswirken. Basolaterale Effluxmechanismen wurden als alternative Route für den Export organischer Anionen wie Bilirubin und Gallensäuren vermehrt exprimiert. MRP3 spielt dabei wohl nicht die Hauptrolle, da es nur bei Zollner et al. in erhöhter Form vorlag, bei allen anderen Autoren jedoch keinen signifikanten Unterschied zeigte (29, 30, 31, 32). Die nukleären Rezeptoren PXR und CAR induzieren viele Enzyme und Transporter, die zur Metabolisierung toxischer Produkte beitragen (8). Eine Erhöhung wäre deshalb sinnvoll, ihre tatsächliche Reduktion bei Cholestase könnte jedoch Folge einer verminderten Detoxifikationsleistung der Hepatozyten sein (32).

Beim ALGS und CS schienen anhand der Grafiken tendenziell die gleichen adaptiven Mechanismen vorzuliegen, wie bei BA oder PFIC. Lediglich der MRP2-Transporter wirkte bei diesen Syndromen erhöht statt vermindert. Auch hier kann deshalb davon ausgegangen werden, dass die Leber in gleicher Weise auf Cholestase reagierte wie bei Tiermodellen der Cholestase oder bei Erwachsenen mit cholestatischen Erkrankungen. Nur bei CF schienen die adaptiven Mechanismen nicht oder nicht ausreichend stattzufinden. Es konnten aufgrund der großen Spannweite und Fehlerbalken der Ergebnisse, trotz der relativ großen Gruppengröße von $n = 7$, keinerlei Signifikanzen oder Tendenzen hinsichtlich Veränderung der hepatobiliären Transportsysteme oder nukleären Rezeptoren gefunden werden. Eine mögliche Erklärung lieferten Kobelska-Dubiel et al. Sie beschrieben die große Variabilität der CFLD bei CF, die von milder Transaminasenerhöhung bis Leberzirrhose reicht (21). Zwar lag beim Patientenkollektiv dieser Arbeit bei allen CF-Patienten eine Leberzirrhose vor, möglicherweise reagierten diese trotzdem auf verschiedene Weise auf die Erkrankung, die vor allem den Cholangiozytentransporter CFTR und nicht in erster Linie die Hepatozyten betrifft, sodass keine allgemeine Tendenz beobachtet werden kann.

5.3. Korrelation der mRNA-Expression hepatobiliärer Transporter mit laborchemischen Parametern und mit der mRNA-Expression nukleärer Rezeptoren

Im Kap. 4.3. wurde der lineare Zusammenhang zwischen den nukleären Rezeptoren und den verschiedenen hepatobiliären Transportern untersucht, im Kap. 4.4.1. wurde die Korrelation laborchemischer cholestatischer Parameter mit der Expression von nukleären Rezeptoren und den Transportern betrachtet. Ziel der beiden Kapitel war es, ein breiteres Verständnis zur Frage zu entwickeln, ob die hepatobiliären Transporter direkt durch ansteigende Cholestaseprodukte oder indirekt durch nukleäre Rezeptoren reguliert werden. Hierbei muss festgehalten werden, dass der Pearson-Korrelationskoeffizient nur Beobachtungen eines möglichen linearen Zusammenhangs wiedergibt. Es kann keinerlei fundierte Aussage weder über die Richtung des möglichen Wirkzusammenhangs noch über das Vorliegen eines tatsächlichen direkten Zusammenhangs gemacht werden. Es ist immer möglich, dass beide Variablen in Wirklichkeit von einer dritten Variable, beispielsweise einem noch unbekannten Faktor (z.B. Transkriptionsfaktor), abhängen und so ein linearer Zusammenhang vorgetäuscht wird oder dass in Wirklichkeit ein anderer, nicht-linearer Zusammenhang besteht, der mit dem Pearson-Korrelationskoeffizienten nicht beschrieben werden kann (43).

Rolle der nukleären Rezeptoren FXR und SHP

Vom nukleären Rezeptor FXR wurde erwartet, dass er in direktem linearen Zusammenhang mit ansteigenden Gallensäurewerten steht, da er durch diese aktiviert wird (7). Daraufhin soll er für die Aktivierung der Transportsysteme MRP2, MDR3 und OST α/β zur Steigerung des Galleflusses und für die Aktivierung des nukleären Rezeptors SHP verantwortlich sein (6, 8). Vom nukleären Rezeptor SHP wurde angenommen, dass er in direktem negativ-linearen Zusammenhang mit den Aufnahmetransportern NTCP und OATP2 steht, deren Aktivität er senken soll (8).

Es fand sich eine mäßig positive Korrelation zwischen FXR und den Transportern MRP2, MDR3 und MRP3, die alle Effluxsysteme in der Metabolisierung von Gallensäuren darstellen. Die Induktion von MRP2 und MDR3 durch FXR wurde in der Literatur bereits beschrieben, die Korrelation mit MRP3 erwies sich als neu (6, 9, 27). Ein Zusammenhang zwischen FXR und dem basolateralen Effluxmechanismus OST α/β , wie in einigen Arbeiten dargestellt, konnte jedoch bei diesem Patientenkollektiv nicht gefunden werden (6, 8). Auch eine eindeutige Induktion des nukleären Rezeptors SHP durch FXR, der daraufhin die

Aufnahmesysteme NTCP und OATP2 reduziert, konnte mit einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von +0,331 nicht gefunden werden (5, 6, 8, 9). Im Gegensatz dazu schienen die Aufnahmetransporter NTCP und OATP2 sogar in einer leicht positiven Beziehung mit den nukleären Rezeptoren FXR und SHP zu stehen. Die Korrelation zwischen FXR und OATP2 erwies sich mit einem Koeffizienten von +0,597 unerwarteterweise sogar als deutlich positiv, was für eine Aktivierung der Aufnahmetransporter durch FXR und SHP spricht. Ursächlich für diesen offensichtlichen Widerspruch zu den Ergebnissen anderer Autoren könnte ein Scheinzusammenhang zwischen FXR und den Aufnahmetransportern in dieser Arbeit sein, die über einen noch unbekannten Mechanismus bei dem untersuchten Patientenkollektiv gleichsam reduziert wurden (6, 7, 8).

Da sich die Aufnahmetransporter NTCP und OATP2 bei BA und PFIC in Kap. 4.2.1. insgesamt als vermindert exprimiert erwiesen, schienen bei diesem Patientenkollektiv andere Mechanismen zur Genregulation stärker gewesen zu sein als die Regulation über FXR. In Kap. 4.4.1. konnten keinerlei Zusammenhänge zwischen Bilirubin, Gallensäuren und den nukleären Rezeptoren hergestellt werden, obwohl die Gallensäuren als Hauptinduktoren von FXR gelten (27). Zudem blieben einerseits FXR, SHP und der von FXR regulierte Transporter MRP2 bei den cholestatischen Krankheitsbildern dieser Arbeit unverändert exprimiert, andererseits konnten deutliche Korrelationen zwischen laborchemischen Parametern und vielen Transportern gefunden werden. Deshalb könnte es sein, dass bei den untersuchten Krankheitsbildern die Regulation der Gentranskription über nukleäre Rezeptoren nicht mehr in der gleichen Weise funktionierte wie dies in einer gesunden Leber der Fall ist. Chen et al. und Zollner et al. beschrieben bereits die möglicherweise ungünstigen Folgen einer FXR-Induktion bei obstruktiver Cholestase durch Erhöhung des Galleflusses und somit des biliären Drucks (6, 32). Es liegt die Schlussfolgerung nahe, dass bei Cholestase im Endstadium der nukleäre Rezeptor FXR eine geringere Rolle spielt und stattdessen stark akkumulierende toxische Substanzen auf anderen, eventuell direkten Wegen ihre Verstoffwechselung regulieren.

Regulation kanalikulärer und basolateraler Effluxtransporter durch Bilirubin und Gallensäuren

So zeigten sich deutliche bis mäßig positive Zusammenhänge zwischen Bilirubin und den Effluxpumpen MDR1, FIC1, CFTR, MRP3, MRP4 und OST α/β . NTCP stand mit Bilirubin in negativem Zusammenhang. Auch zwischen Taurocholaten und den Effluxpumpen MDR1, FIC1, CFTR und MRP4 konnte eine positive Beziehung festgestellt werden, während die

Aufnahmetransporter NTCP und OATP2 negativ beeinflusst wurden. MDR1 schien zusätzlich durch Glykocholate induziert zu werden. All diese Zusammenhänge stimmen mit in der Literatur beschriebenen Korrelationen überein (26, 29, 30). Es scheint, dass Bilirubin und Gallensäuren bei Akkumulation ihre eigene Aufnahme hemmen und gleichzeitig ihren Efflux ins Blut sowie die Sekretion von Phospholipiden und Chlorid in die Gallengänge erhöhen.

Einer direkten Regulation von Transportern durch Bilirubin und Gallensäuren gegenüber steht die deutlich positive Korrelation des nukleären Rezeptors SHP mit den Effluxtransportern MDR3, FIC1, MRP3 und OST α/β , die bei Cholestase, wie in Kap. 4.2. beschrieben, nachweislich hochreguliert werden. Auch MRP2 korrelierte mit einem Pearson-Koeffizienten von +0,416 mäßig positiv mit SHP. All dies deutet auf eine Regulierung der genannten Transporter durch diesen nukleären Rezeptor hin. SHP erwies sich in Kap. 4.2.4. jedoch als unverändert exprimiert. Eine Erklärung hierfür könnten die Ergebnisse von Kap. 4.4.2. liefern. Bei der Untersuchung, ob Unterschiede der Genexpression bei verschiedenen Cholestasegraden vorlagen, fand sich eine signifikante Erhöhung der SHP-mRNA bei schwerer Cholestase. Da bei der Betrachtung der Genexpressionsveränderung bei einzelnen Krankheitsgruppen Kinder mit allen histologischen Cholestasegraden mit eingeschlossen waren und sich hier hinsichtlich SHP-Expression kein signifikanter Unterschied fand, scheint die Induktion von SHP ein spätes Ereignis bei Cholestase im Endstadium zu sein. Beim nukleären Rezeptor FXR fand sich jedoch auch im Stadium der schweren Cholestase kein signifikanter Unterschied, sodass der Mechanismus der Hochregulation von SHP bei schwerer Cholestase unklar bleibt.

Insgesamt schienen viele kanalikuläre und basolaterale Transporter auf direktem Weg durch bei schwerer Cholestase ansteigende Stoffwechselprodukte wie Bilirubin und Gallensäuren sowie zusätzlich auf indirektem Weg durch SHP reguliert zu werden.

Rolle der nukleären Rezeptoren PXR und CAR

Bei den nukleären Rezeptoren PXR und CAR wurde lediglich eine positive lineare Korrelation zwischen CAR und den Werten für Bilirubin erwartet, da Bilirubin einen CAR-Ligand darstellt (5). Die restlichen Liganden für PXR und CAR sind Xenobiotika, die in Kap. 4.4.1. nicht untersucht wurden (6, 9). Es wurde damit gerechnet, bei PXR einen positiven Zusammenhang mit dem Aufnahmetransporter OATP2 und den Effluxpumpen MDR1 und MRP2 zu finden, bei CAR mit MRP2, MRP3 und MRP4 (8, 9).

Eine große Rolle bei der Regulation der hepatobiliären Transporter schienen die nukleären Rezeptoren PXR und CAR bei dem Patientenkollektiv dieser Arbeit nach Betrachtung der Ergebnisse nicht zu spielen. Es fand sich keine relevante Korrelation zwischen den Blutwerten für Bilirubin, Glyko- oder Taurocholate und PXR oder CAR. Dies stimmt bis auf die fehlende Korrelation von CAR und Bilirubin mit der Erwartungshaltung überein. PXR schien mit den Aufnahmemechanismen NTCP und OATP2 in positiver Weise zu korrelieren. Für OATP2 wurde eine Regulation durch PXR bereits von einigen Autoren beschrieben (5, 9, 27). Laut Literatur sollen auch MDR1, MRP2 und MRP4 durch PXR induziert werden, was in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden konnte (5, 8, 9, 27). Der nukleäre Rezeptor CAR soll die Effluxsysteme MRP2, MRP3 und MRP4 und den Aufnahmetransporter OATP2 induzieren, um eine Bilirubin-Ausscheidung zu gewährleisten (5, 6, 8, 9, 27). Dieser Zusammenhang konnte nur für den Transporter OATP2 bestätigt werden. Zusätzlich fand sich eine positive Korrelation zwischen CAR und NTCP. Die Tatsache, dass auch hier Transporter wie NTCP und OATP2, die positiv mit PXR und CAR korrelierten, beim Patientenkollektiv vermindert exprimiert waren, deutet zusammen mit der Tatsache, dass PXR und CAR bei BA signifikant herunterreguliert waren, darauf hin, dass die Regulation der hepatobiliären Transporter durch PXR und CAR bei fortgeschrittenen Krankheitsstadien eine untergeordnete Rolle spielt. Chen et al. erklärten die Reduktion dieser nukleären Rezeptoren als Folge einer verminderten Detoxifikationsfähigkeit der geschädigten Hepatozyten (32).

5.4. Korrelation von histopathologischen und klinischen Parametern mit der mRNA-Expression der hepatobiliären Transporter und nukleären Rezeptoren

Histologische Parameter und deren Zusammenhang mit der Genexpression

In Kap. 4.4.2. wurden die Unterschiede der Genexpression hepatobiliärer Transporter und nukleärer Rezeptoren bei unterschiedlichen Schweregraden an Cholestase und Inflammation betrachtet. Hinsichtlich des Cholestasegrades konnten signifikante Unterschiede nur bei schwerer Cholestase gefunden werden, was darauf hindeutet, dass adaptive Mechanismen erst bei stärkerer Akkumulation toxischer Substanzen voll zum Tragen kommen. So schien die Reduktion der Aufnahmetransporter NTCP und OATP2 erst bei schwerer Cholestase stattzufinden. Auch Zollner et al. konnten bei den frühen PBC-Stadien 1 und 2 keine signifikante Reduktion von NTCP und OATP2 feststellen und beschrieben die Reduktion der basolateralen Aufnahmemechanismen bei der PBC als sekundäres Ereignis (29, 30). Chen et al. stellten dagegen bereits im frühen Stadium der BA eine signifikant verminderte Expression beider Aufnahmetransporter fest (32). Dass OATP2 anhand der Grafiken bereits bei leichter und mittelgradiger Cholestase reduziert wirkte, legt die Vermutung nahe, dass auch bei den Kindern dieser Arbeit in frühen Cholestasestadien bereits eine beginnende Reduktion der Aufnahmetransporter stattfand. Eine Ursache dafür, dass dennoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich der adaptiven Mechanismen in früheren Cholestasestadien gefunden wurden, könnte auch die niedrige Fallzahl in den Gruppen mit leichter ($n = 7$) und mittelgradiger ($n = 3$) Cholestase sein.

Bezüglich der Regulation von MRP2 und FXR konnten auch bei verschiedenen Cholestase- und Inflammationsstadien keinerlei signifikante Unterschiede festgestellt werden. Chen et al. fanden dagegen MRP2 und FXR in frühen Krankheitsstadien vermindert exprimiert vor und begründeten dies als Schutzmechanismus vor zu hohem Galleddruck in den Kanalikuli (32). Dass dies in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnte, könnte daran liegen, dass die Lebergewebeproben, in denen histologisch nur eine milde Cholestase gefunden wurde, trotzdem von Kindern mit zirrhotischer Leber stammten, die somit an einem Endstadium ihrer Krankheit und nicht mehr an einem frühen Stadium litten, wie das bei Chen et al. im Rahmen der Kasai-Operation der Fall war. Die Tatsache, dass alle zwei Gene unverändert exprimiert waren, stützt die Hypothese aus Kap. 5.2., dass MRP2 und FXR auch bei schwerer Cholestase kontinuierlich exprimiert bleiben um den bidirektionalen Gallefluss zu gewährleisten und dass

sie hinsichtlich adaptiver Mechanismen bei schwerer Cholestase eine untergeordnete Rolle spielen.

PXR und CAR zeigten sich bereits in Kap. 4.2. bei Kindern mit BA signifikant reduziert. Da diese beiden nukleären Rezeptoren nun auch bei Betrachtung einzelner Cholestasestadien nicht die zu erwartende Hochregulation aufwiesen, sondern unverändert exprimiert waren, scheinen sie deshalb in fortgeschrittenen Krankheitsstadien kaum mehr eine Rolle zu spielen. Chen et al. fanden bei Kindern mit einem späten Stadium von BA ebenfalls eine unveränderte Genexpression von CAR, aber signifikant reduzierte Expressionswerte von PXR. Die in Kap. 5.2. bereits geäußerte Hypothese von Chen et al., dass eine verminderte Detoxifikationsfähigkeit der Leber mit reduzierten Genexpressionswerten von PXR und CAR zusammenhängt, wird somit auch durch die Ergebnisse aus Kap. 4.4.2. gestützt (32). Dies liefert auch eine Erklärung für die signifikant reduzierten Expressionswerte von PXR und CAR bei schwerer Inflammation, die durch ein Unvermögen der Leber, schädigende Substanzen abzubauen, entstanden sein könnte.

Die Effluxtransporter MDR1 und FIC1 zeigten sich bereits in frühen Cholestasestadien vermehrt exprimiert, eine statistisch signifikante Erhöhung wurde jedoch nur bei schwerer Cholestase gefunden. Auch MDR3 und CFTR waren bei schwerer Cholestase vermehrt exprimiert. Chen et al. beschrieben ebenfalls die vermehrte Expression von MDR1 und MDR3 in späten Stadien der BA. MDR1 erschien auch in ihrer Arbeit im frühen Stadium der BA erhöht, wenn auch nicht signifikant, während MDR3 bei Chen et al. im frühen BA-Stadium signifikant vermindert exprimiert war. Sie nahmen an, dass eine Reduktion von kanalikulären Transportern zu Beginn der Cholestase einem erhöhten Galledruck entgegenwirkt (32). Eine solche Reduktion konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Auch hier muss erwähnt werden, dass die Kinder dieser Arbeit alle bereits an Leberzirrhose litten und deshalb trotz des histologischen Befundes kein frühes Krankheitsstadium mehr aufwiesen.

Die basolateralen Effluxtransporter MRP3 und MRP4 wurden erst bei schwerer Cholestase hochgefahren. OST α/β wirkte schon in früheren Stadien erhöht, war aber auch erst bei schwerer Cholestase signifikant vermehrt exprimiert. Eine Hochregulation basolateraler Transportsysteme, die ihre Substrate zurück ins Pfortaderblut transportieren, wurde bereits bei verschiedenen cholestatischen Krankheitsbildern nachgewiesen (Kap. 4.2.). Auch Chen et al. fanden den MRP4-Transporter erst im späten Stadium der BA erhöht, während OST α/β

bereits im frühen Stadium signifikant erhöht war. Der MRP3-Transporter erwies sich in ihrer Arbeit in beiden Stadien als unverändert exprimiert (32). Bei Zollner et al. zeigte sich der MRP3-Transporter im PBC-Stadium 4 im Western-Blot signifikant vermehrt, während in früheren PBC-Stadien keine signifikante Aktivierung nachgewiesen wurde (30). Dass MRP3 und MRP4 erst bei schwerer Cholestase vermehrt exprimiert wurden, während andere Transporter anhand der Abb. 17-19 schon früher verändert erschienen, zeigt, dass dieser Weg einen Reservemechanismus bei besonders hoher Akkumulation toxischer Produkte darstellt (6, 28). Eventuell kann deshalb in Zukunft versucht werden, diese Transportsysteme bereits in früheren Stadien durch geeignete Liganden zu aktivieren, um eine starke Akkumulation toxischer Gallebestandteile von vornherein zu verhindern (27).

Der nukleäre Rezeptor SHP, der bei Betrachtung aller Cholestasestadien in Kap. 4.2. unverändert exprimiert war, stellte sich im Stadium „schwere Cholestase“ nun vermehrt exprimiert dar. Da nun einerseits sowohl SHP als auch die Transportsysteme MDR3, MRP3, MRP4, OST α/β und NTCP tendenziell erst bei schwerer Cholestase hoch- bzw. heruntergefahren wurden und andererseits in Kap. 5.2. ein positiver linearer Zusammenhang zwischen SHP und MDR3, MRP3 und OST α/β gefunden wurde, drängt sich der Gedanke auf, dass deren Regulation durch SHP beeinflusst sein könnte. Da bisher lediglich eine Suppression der Enzyme CYP7A1, CYP8B1 sowie der Aufnahmetransporter NTCP und OATP2 durch SHP beschrieben wurde, sollte in Zukunft noch eine genauere Untersuchung der Wirkung von SHP auf die restlichen hepatobiliären Transporter erfolgen (8, 9). Wenn diesbezüglich tatsächlich ein Zusammenhang gefunden werden kann, könnte man versuchen, auch hier bereits in frühen Cholestasestadien mit einem geeigneten Liganden die Aktivität von SHP zu erhöhen.

Hinsichtlich der Inflammation fiel auf, dass vor allem die kanalikulären Effluxtransporter MDR1, FIC1 und MDR3 sowie die Transporter MRP4 und CFTR bei Inflammation vermehrt exprimiert waren. Deren Erhöhung konnte man jedoch auch bei den bei Cholestase gefundenen adaptiven Mechanismen (Kap. 4.2. und Kap. 4.4.2.) beobachten. Die Wirkung von inflammatorischen Signalwegen auf die Expression hepatobiliärer Transporter wurde vor allem für MDR1 bereits mehrfach untersucht. So beschrieben mehrere Autoren eine signifikante Reduktion der MDR1-mRNA in Zellen, die mit proinflammatorischen Zytokinen behandelt wurden (57, 58, 59). Dies zeigt, dass Inflammation ebenfalls eine Rolle in der Regulation hepatobiliärer Transporter spielt und bedacht werden muss. Da MDR1 in dieser Arbeit aber signifikant vermehrt exprimiert war, was mit den bereits bekannten adaptiven

Mechanismen bei Cholestase einhergeht, wird davon ausgegangen, dass die Akkumulation cholestatischer Produkte in den Hepatozyten bei den Kindern dieser Arbeit eine größere Rolle spielte als die Inflammation (30, 31, 32).

Zusammenfassend konnten bei schwerem Cholestasegrad die gleichen Adaptionsmechanismen gefunden werden wie bei früheren Fragestellungen. Wie schon erwähnt, zeigte sich jedoch im Gegensatz zu früheren Ergebnissen bei schwerer Cholestase eine signifikante Erhöhung des nukleären Rezeptors SHP, der möglicherweise einige dieser Adaptionsmechanismen steuert und weiter untersucht werden muss. Da die bei Inflammation gefundenen Veränderungen der Genexpression den adaptiven Mechanismen bei Cholestase entsprachen, wird davon ausgegangen, dass akkumulierende cholestatische Produkte für diese Veränderungen verantwortlich waren und Inflammation als sekundäre Erscheinung der Cholestase auftritt.

Klinische Parameter und deren Zusammenhang mit der Genexpression

Im Kap. 4.4.3. sollte geklärt werden, ob es Unterschiede in der Genexpression gibt zwischen Kindern, die unter verschiedenen cholestatischen Symptomen litten und Kindern, die nicht daran litten. Wäre dies der Fall, könnten die Ergebnisse Ansatzpunkte für neue Medikamente bei Cholestase liefern. Es wurde erwartet, dass Kinder, die die Symptome Ikterus, acholischer Stuhl, dunkler Urin und Juckreiz aufwiesen, höhere Blutwerte von Bilirubin und Gallensäuren hatten. Eine Erhöhung von Bilirubin und Gallensäuren bei Cholestase wurde durch die Reduktion der Aufnahmetransporter NTCP und OATP2 und die Verminderung der kanalikulären Exportsysteme mit einer kompensatorischen Erhöhung der basolateralen Effluxsysteme MRP3, MRP4 und OST α/β erwartet (5, 6, 7, 8, 29, 36). Auf Ebene der nukleären Rezeptoren wurde erwartet, dass Kinder mit Cholestasesymptomen eine verminderte Expression von FXR, PXR und CAR aufwiesen, da diese nukleären Rezeptoren normalerweise die Detoxifikation und den Gallefluss fördern (6, 8, 9).

Bei der Untersuchung, ob es Zusammenhänge zwischen den typischen klinischen Symptomen einer cholestatischen Erkrankung und der Genexpression der hepatobiliären Transporter oder der nukleären Rezeptoren gibt, zeigte sich der Aufnahmetransporter OATP2 sowohl bei Kindern mit Hautikterus als auch bei Kindern mit dunklem Urin vermindert exprimiert. Dieser Mechanismus, der die Hepatozyten vor Akkumulation von Bilirubin und Gallensäuren schützen soll, bewirkt auf der anderen Seite durch eine verminderte Aufnahme von Bilirubin aus dem Blut dessen Einlagerung in Haut und Schleimhäute sowie dessen Ausscheidung mit

dem Urin (7, 8, 11, 30, 36). Bei Kindern mit dunklem Urin war außerdem der Effluxtransporter OST α / β erhöht. In Folge werden vermehrt wasserlösliche Substanzen ins Blut transportiert und deren renale Elimination erhöht, was die Symptome erklärt (6).

FXR erwies sich bei dunklem Urin und acholischem Stuhl als signifikant vermindert. FXR erhöht unter normalen Umständen vor allem über Induktion apikaler Transporter wie MRP2 den Gallefluss (6, 32). Bei der Untersuchung der adaptiven Mechanismen bei Cholestase waren sowohl FXR als auch MRP2 unverändert exprimiert (Kap. 4.2.), während Chen et al. in frühen Cholestasestadien diese zwei Gene vermindert exprimiert fanden und dies als Schutz vor zu hohem Galledruck in den Gallengängen interpretierten (32). Möglicherweise fand eine solche Reduktion zum Schutz der Hepatozyten auch bei Kindern mit cholestatischen Symptomen statt. Eine kompensatorisch erhöhte Ausschleusung cholestatischer Produkte über basolaterale Transporter konnte bei Kindern mit dunklem Urin, wie oben beschrieben, in Form eines erhöhten OST α / β -Transporters gefunden werden (7, 28, 30, 31).

Die Effluxpumpen MDR1, FIC1 und CFTR zeigten sich bei Kindern mit Juckreiz signifikant vermindert. Da alle drei Transporter die Hepatozyten und Cholangiozyten durch ihre Sekretionsarbeit vor toxischen Substanzen schützen, könnte bei Verminderung dieser Transporter eine vermehrte Schädigung auftreten, in deren Folge Tight-Junctions zwischen den Hepatozyten gelockert und toxische Substanzen vermehrt ins Blut übertreten können (6, 7, 9, 30). Ein solcher Mechanismus wurde auch von Trauner et al. bei Ratten mit Cholestase infolge Gallengangsligatur beschrieben (26). Eine andere Erklärung wäre, dass bei Kindern mit verminderter Genexpression von MDR1, FIC1 und CFTR ein vermehrter Rückstau gallepflichtiger Substanzen stattfand und diese durch kompensatorisch erhöhte basolaterale Effluxmechanismen zurück ins Blut transportiert wurden. Da aber MRP4 bei diesen Kindern nicht wie zu erwarten erhöht, sondern signifikant reduziert war und die Transporter MRP3 und OST α / β keine veränderte Expression aufwiesen, erscheint dies unwahrscheinlich. Eine Reduktion von MDR1, FIC1 und CFTR steht außerdem im Gegensatz zu den bei Cholestase gefundenen adaptiven Mechanismen. Möglicherweise war die Kompensationsfähigkeit der Hepatozyten bei Cholestase bei Kindern mit Juckreiz daher vermindert. Der nukleäre Rezeptor PXR war bei der Untersuchung der adaptiven Mechanismen bei Cholestase in dieser Arbeit (Kap. 4.2.) sowie bei Chen et al. signifikant reduziert, was mit einer verminderten Detoxifikationsfähigkeit der Hepatozyten erklärt wurde (32). Für die gefundene signifikante Erhöhung des PXR-Rezeptors bei Kindern mit Juckreiz kann deshalb keine Erklärung gefunden werden.

Hinsichtlich des Ansprechens auf Antipruritus-Medikamente wurde erwartet, dass Patienten, die darauf ansprachen, signifikant erhöhte Genexpressionswerte von FXR und vor allem PXR und CAR aufwiesen, da die Antipruritus-Medikamente Liganden dieser Rezeptoren darstellen (6, 8, 9, 27, 33, 35). Infolgedessen sollten sowohl Aufnahmetransporter als auch Effluxmechanismen ansteigen (8, 9). Patienten, die auf Antijuckreiz-Medikamente angesprochen haben, wiesen jedoch gegenüber Non-Respondern signifikant erniedrigte Spiegel an NTCP und CAR auf. Signifikant reduzierte Spiegel von NTCP und CAR fanden sich auch im Rahmen der adaptiven Mechanismen bei Cholestase in Kap. 4.2. Es könnte daher sein, dass die gefundenen Ergebnisse aus Kap. 4.4.3. diese adaptiven Mechanismen widerspiegeln und nicht auf eine Wirkung der Antipruritus-Medikamente zurückzuführen sind. Dies macht erneut deutlich, dass die adaptiven Mechanismen zum Schutz der Hepatozyten bei schwerer Cholestase im Vordergrund stehen und die Regulation über nukleäre Rezeptoren, die bei gesunden Lebern durch Antipruritus-Medikamente gefördert wird, bei diesem Patientenkollektiv aus dem Gleichgewicht gebracht und nicht mehr nachweisbar war. Die adaptiven Mechanismen bewirken zwar auf der einen Seite einen Schutz des Hepatozyten vor akkumulierenden Substanzen, auf der anderen Seite verstärken sie im Endstadium der Cholestase durch Reduktion der Aufnahmetransporter und Aktivierung der basolateralen Effluxmechanismen die cholestatischen Symptome. Die einzige Möglichkeit, sowohl Hepatozyten vor Schaden zu schützen als auch die cholestatischen Symptome der Kinder zu lindern, scheint deshalb eine möglichst frühzeitige Aktivierung nukleärer Rezeptoren durch geeignete Liganden zu sein, zu einem Zeitpunkt, an dem die normale Regulation der Transporter über nukleäre Rezeptoren noch funktioniert und eine komplette Kompensation erreicht werden kann (27). Dies sollte auch das Ziel zukünftiger Forschungen sein.

Eventuell wurden bei den Kindern, die auf die Antijuckreiz-Medikation ansprachen, Mechanismen zur Eliminierung von Gallensäuren in Gang gesetzt, die nicht auf Transporterebene ablaufen. So ist bekannt, dass durch die Gabe der nicht-toxischen Gallensäure UDCA der Pool an toxischen Gallensäuren ersetzt und reduziert wird (23). Möglicherweise könnte durch diesen Mechanismus eine Linderung des Juckreizes stattgefunden haben, auch wenn die Regulation der Transporter über nukleäre Rezeptoren nicht mehr ausreichend funktionierte.

5.5. Einfluss herkömmlicher Antipruritus-Medikamente auf die mRNA-Expression der hepatobiliären Transporter und nukleären Rezeptoren

Im Kap. 4.5. wurde untersucht, wie sich die Einnahme der gängigen Antipruritus-Medikamente UDCA, PB und RMP auf die Genexpression der Transporter und nukleären Rezeptoren auswirkt. Es wurde damit gerechnet, dass FXR schwach durch UDCA, CAR vor allem durch PB und PXR durch alle drei Medikamente induziert wird (6, 9). Infolgedessen sollten die Genexpressionen für Aufnahmetransporter und Effluxtransporter bei Kindern, die diese Medikamente nahmen, im Vergleich zu Kindern, die kein derartiges Medikament erhielten, ansteigen (9, 27).

Das Problem bei der Untersuchung des Einflusses der Antipruritus-Medikamente auf die Genexpression der hepatobiliären Transporter stellte auch hier die geringe Gruppengröße dar. Während die Kinder, die nur UDCA einnahmen, mit $n = 62$ die größte Gruppe darstellten, waren die Medikamentengruppen „UDCA+RMP“ und „UDCA+PB“ jeweils nur mit $n = 3$ und „UDCA+RMP+PB“ nur mit $n = 1$ vertreten. Auch in diesem Fall waren statistische Aussagen bezüglich der letztgenannten Gruppen nicht aussagekräftig und waren daher lediglich zum Überblick gedacht.

Es fand sich nur beim CFTR-Transporter eine signifikante Reduktion bei den Medikamentengruppen „UDCA+PB“ und „UDCA+RMP“. Diese scheint auf den ersten Blick wenig Sinn zu machen, da CFTR den Gallefluss fördert und dies eines der Ziele der Medikamentengabe ist (4, 21). Leider konnte über die Regulation des CFTR-Transporters durch nukleäre Rezeptoren in der Literatur nichts gefunden werden und es korrelierte kein nukleärer Rezeptor in signifikanter Weise mit dem CFTR-Transporter (Kap. 4.3.). Sowohl Trauner et al. als auch Kobelska-Dubiel et al. schrieben, dass UDCA die Chloridsekretion fördert (21, 26). Eventuell kann bei Kindern mit durch UDCA stimulierter Transporteraktivität die Nachproduktionsrate der mRNA gesenkt werden. Es könnte jedoch auch sein, dass die Kausalität umgekehrt ist und dass Kindern mit niedrig exprimiertem CFTR, die nicht auf UDCA angesprochen haben, ein zweites Medikament gegeben wurde. Xu et al. stellten bereits dar, dass die Regulation des CFTR-Transporters komplex ist (56). Welche Mechanismen genau zu einer Reduktion des CFTR-Transporters geführt haben, kann daher nicht geklärt werden. Bei den restlichen Transportern und nukleären Rezeptoren fanden sich überraschenderweise keine signifikanten Unterschiede.

Zur Untersuchung der Auswirkungen von PB auf die Transporterexpression spritzten Hagenbuch et al. Ratten intraperitoneal PB oder NaCl (34). Laut Boyer soll PB vor allem den nukleären Rezeptor CAR induzieren und als Folge OATP2 und MRP2, die für die Bilirubin-Clearance wichtig sind, aktivieren (8). Hagenbuch et al. fanden in der Tat signifikant erhöhte Werte an OATP2 und auch MRP2 wirkte stimuliert (34). Auch in dieser Arbeit wirkten in der Medikamentengruppe „UDCA+RMP+PB“ die Transporter OATP2 und MRP2 deutlich, CAR mäßig erhöht. Bei der Untersuchung der adaptiven Mechanismen bei Cholestase in Kap. 4.2. fanden sich jedoch genau die entgegengesetzten Mechanismen: OATP2 und CAR waren signifikant reduziert.

RMP soll den nukleären Rezeptor PXR, einige Detoxifikationssysteme und die Effluxpumpe MRP2 induzieren und damit vor allem den Juckreiz lindern (8, 33). Marschall et al. fanden bei Patienten mit Cholezystektomie, die in der Woche vor Eingriff RMP erhielten, keine signifikanten Unterschiede von PXR, jedoch erhöhte Expressionswerte von MRP2 (33). Bei Benson et al., die Hepatozyten 24 Stunden mit RMP inkubierten, zeigten sich neben erhöhten MRP2-Werten auch signifikant erhöhte Werte der Effluxpumpen MDR1, MRP3 und OST α/β (35). Auch in dieser Arbeit wirkten in der Medikamentengruppe „UDCA+RMP“ die Transporter MRP2 und OST α/β und der nukleäre Rezeptor PXR vermehrt exprimiert. Die Daten aus Kap. 4.2. lassen erkennen, dass hier ebenfalls gegensätzliche Ergebnisse hinsichtlich der adaptiven Mechanismen bei Cholestase vorliegen. Zwar fand sich auch dort der Transporter OST α/β erhöht, bei MRP2 zeigte sich jedoch kein Unterschied, während PXR vermindert exprimiert war.

Fickert et al. schrieben in ihrer Arbeit, dass UDCA den Gallefluss fördert und Transporter stimuliert, die bei Cholestase normalerweise reduziert werden (36). So soll UDCA über PXR und FXR den Aufnahmetransporter OATP2 und die Effluxpumpen MRP2, MDR1, MDR3 und MRP4 induzieren (27, 30, 33, 36). Auch in dieser Arbeit wirkten in der „UDCA+RMP“-Gruppe die Transporter MRP2 und MDR3 erhöht, wenn auch nicht signifikant. Bei Fickert et al. stellte sich heraus, dass eine Fütterung von Cholsäure bei Mäusen im Gegensatz zur Fütterung mit UDCA den Aufnahmetransporter NTCP reduzierte. Cholsäure stellte in diesem Modell die Anreicherung der Hepatozyten mit einer toxischen Gallensäure dar, was dem Mechanismus bei Cholestase nahe kommt (36).

Generell wird in der Literatur angegeben, dass Antipruritus-Medikamente die Aufnahme und bidirektionale Elimination von Gallensäuren und Bilirubin fördern und vor allem die

nukleären Rezeptoren PXR und CAR induzieren (8, 9, 27). Alle diese Mechanismen zeichneten sich, wenn auch ohne statistische Signifikanz, auch in Kap. 4.5. ab. Es lag somit ein großer Unterschied zwischen der erwarteten Wirkung der Antipruritus-Medikamente und den gefundenen adaptiven Mechanismen bei Cholestase aus Kap. 4.2. vor, bei denen die Aufnahmetransporter und die nukleären Rezeptoren PXR und CAR reduziert waren und kein Unterschied hinsichtlich der Expression von MRP2 gefunden werden konnte. Dies könnte daran liegen, dass in der Literatur hinsichtlich der Medikamentenwirkung ausschließlich gesunde Nagetiere, Hepatozyten oder Patienten mit Cholezystektomie bei Gallensteinen untersucht wurden (27, 33, 34, 35, 36). Bei keinem dieser Versuchsobjekte lag demnach eine Cholestase vor, wie es bei den Kindern dieser Arbeit der Fall war. Bei Cholestase im Endstadium scheinen die Akkumulation toxischer Produkte und der Leberschaden so groß zu sein, dass adaptive Mechanismen zum Schutz der Zellen im Vordergrund stehen und Medikamente nicht mehr ihre volle Wirkung entfalten können. Auch hier wird deshalb geschlussfolgert, dass geeignete Liganden möglichst frühzeitig, vor Einsetzen der adaptiven Mechanismen, zum Einsatz kommen sollten (27). Neue Medikamente mit dem Ziel, die nukleären Rezeptoren FXR, PXR und CAR zu aktivieren und Aufnahme- sowie Effluxsysteme in frühen Krankheitsstadien zu induzieren, sollten in Zukunft erprobt werden.

6. Zusammenfassung

Cholestase bezeichnet einen gestörten Abfluss von Galle oder ihrer Bestandteile. Infolgedessen kommt es zu Ablagerungen gallepflichtiger Substanzen wie Bilirubin oder Gallensäuren in Hepatozyten und Gallengängen, was zu deren Schädigung und zu Leberzirrhose führen kann. Eine Retention dieser Substanzen im Körper ruft zudem die cholestatischen Symptome Ikterus, Juckreiz, dunkler Urin und acholischer Stuhl hervor.

Die extrahepatische Gallengangsatresie, das Caroli- und das Alagille-Syndrom gehören zu den obstruktiven, die Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase und die Cystische Fibrose zu den hepatozellulären Ursachen für cholestatische Krankheiten bei Kindern.

Zahlreiche Transportsysteme für Gallensäuren und Bilirubin gewährleisten deren Aufnahme in den Hepatozyten (NTCP, OATP2) und deren Abgabe in Gallengänge/Kanalikuli (MRP2, MDR1, MDR3, FIC1) sowie zurück ins Blut (MRP3, MRP4, OST α/β). Der CFTR-Transporter sorgt im Cholangiozyten für den Wasser- und Elektrolythaushalt der Galle und somit für den Gallefluss. Reguliert werden diese Transporter u.a. durch die nukleären Rezeptoren FXR, SHP, PXR und CAR, die durch körpereigene Stoffwechselprodukte oder die Antipruritus-Medikamente Ursodeoxycholsäure, Phenobarbital und Rifampicin aktiviert werden und in Folge die Gentranskription beeinflussen können.

Es ist bereits bekannt, dass bei Cholestase adaptive Mechanismen in Kraft treten, die die Hepatozyten vor Schaden bewahren sollen. Diese schließen die Reduktion basolateraler Aufnahmetransporter und die vermehrte Expression von Effluxtransportern ein. Bisher wurden diese adaptiven Mechanismen hauptsächlich bei Tiermodellen oder bei Erwachsenen mit cholestatischen Erkrankungen untersucht. Es stellte sich daher die Frage, wie diese Mechanismen und deren Wechselwirkungen bei Kindern aussehen und welche Rolle nukleäre Rezeptoren und Antipruritus-Medikamente in deren Regulation spielen.

Für diese Fragestellung wurde Lebergewebe von 77 Kindern mit cholestatischen Krankheiten und von sieben Kindern mit nicht-cholestatischen Krankheiten verwendet, das im Rahmen von Leberresektionen oder -biopsien gewonnen worden war und daraus die totale RNA isoliert. Durch qRT-PCR wurde anschließend die Expression der zehn Transportergene und der vier Gene für nukleäre Rezeptoren analysiert. Zudem wurden klinische, histologische und laborchemische Daten zu den gewonnenen Gewebeproben sowie Daten zu cholestatischen Symptomen und zur Medikamenteneinnahme gesammelt.

Die BA stellte in dieser Arbeit mit 73% die größte, die CF mit 9% und die PFIC mit 5% die zweit- und drittgrößte Krankheitsgruppe dar, über die somit die meisten Aussagen getroffen werden konnten. Die niedrige Fallzahl stellte bei den restlichen Krankheiten hinsichtlich der statistischen Aussagekraft ein Problem dar.

Beim Vergleich der Genexpression zwischen verschiedenen cholestatischen Krankheiten und den Vergleichsproben zeichneten sich bei BA und PFIC die gleichen adaptiven Mechanismen ab wie in Tiermodellen der Cholestase und bei Erwachsenen mit cholestatischen Erkrankungen. NTCP und OATP2 wurden reduziert, die Effluxsysteme MDR1, MDR3, FIC1, CFTR, MRP4, OST α/β wurden aktiviert. MRP2 zeigte sich in der gesamten Arbeit unverändert exprimiert und stellt somit wohl eine feste Größe im Gallensäuretransport dar.

Die Regulation hepatobiliärer Transporter durch nukleäre Rezeptoren schien in diesem Patientenkollektiv nicht zu greifen, da FXR unverändert exprimiert war, keinerlei Korrelation mit den Werten der Serumgallensäuren zeigte und Transporter wie MRP2, die durch FXR aktiviert werden, unverändert blieben. Zudem zeigte sich kein linearer Zusammenhang zwischen der Expression von FXR und SHP. PXR und CAR waren bei BA signifikant vermindert exprimiert und zeigten positive lineare Korrelationen mit den Aufnahmesystemen NTCP und OATP2. Diese waren im Rahmen der adaptiven Mechanismen beim Patientenkollektiv jedoch reduziert, sodass auch PXR und CAR bei schwerer Cholestase keine tragende Rolle zuzukommen scheint.

Stattdessen deutete sich eine direkte Regulation von Transportern durch cholestatische Stoffwechselprodukte an. Es konnten positive lineare Korrelationen zwischen Bilirubin und Gallensäuren mit Effluxtransportern sowie negative lineare Korrelationen zwischen Bilirubin und Gallensäuren mit Aufnahmetransportern nachgewiesen werden.

SHP war für alle Cholestasestadien zusammen betrachtet unverändert exprimiert, im Stadium „schwere Cholestase“ allerdings vermehrt vorhanden und korrelierte positiv mit den Effluxtransportern MDR3, FIC1, MRP3 und OST α/β , sodass möglicherweise einige adaptive Mechanismen in späten Stadien durch SHP gesteuert werden, wenn die Regulation über andere nukleäre Rezeptoren nicht mehr funktioniert.

Neben SHP waren im histologischen Stadium „schwere Cholestase“ auch die basolateralen Effluxtransporter MRP3 und MRP4 und die Transporter MDR3 und CFTR vermehrt exprimiert, die Aufnahmetransporter NTCP und OATP2 reduziert. All diese Mechanismen

könnten somit alternative Wege darstellen, die erst bei starker Akkumulation toxischer Produkte zum Schutz der Hepatozyten aktiviert werden.

Der geringe Einfluss der nukleären Rezeptoren FXR, PXR und CAR bei schwerer Cholestase zeigte sich auch, als die Genexpression von Kindern mit und ohne Antipruritus-Medikamenten untersucht wurde. Hier fanden sich bei Medikamenteneinnahme keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Genen hepatobiliärer Transporter oder nukleärer Rezeptoren im Vergleich zu Kindern ohne entsprechende Medikation. Auch bei Kindern, die auf Antipruritus-Medikamente ansprachen, waren nicht wie erwartet FXR, PXR und CAR und nachfolgend sowohl Aufnahme- als auch Effluxtransporter erhöht. Stattdessen zeigten sich NTCP und CAR vermindert exprimiert, wie es bereits bei den adaptiven Mechanismen bei Cholestase beschrieben wurde.

Da es sich beim untersuchten Gewebe um massiv durch Cholestase geschädigtes Lebergewebe handelte, standen vermutlich adaptive Mechanismen zum Schutz der Hepatozyten im Vordergrund. Die Regulation über nukleäre Rezeptoren, die durch Antipruritus-Medikamente gefördert wird, spielte keine tragende Rolle mehr.

Das Problem der adaptiven Mechanismen zeigte sich, als die Genexpression von Kindern mit und ohne klinischen Cholestasesymptomen untersucht wurde. OATP2 war bei Kindern mit Ikterus und dunklem Urin signifikant vermindert, OST α/β bei Kindern mit dunklem Urin signifikant erhöht. So gewährleisteten adaptive Mechanismen einerseits einen Schutz der Hepatozyten vor akkumulierenden Substanzen, andererseits verstärken sie durch verminderte Aufnahme und vermehrten Rücktransport ins Blut die Symptome der Krankheit. Um sowohl Hepatozyten vor Schaden zu bewahren als auch cholestatische Symptome lindern zu können, sollte deshalb versucht werden, möglichst früh in den Krankheitsprozess einzugreifen und nukleäre Rezeptoren zu aktivieren, solange die normale Regulation über nukleäre Rezeptoren noch effektiv ist. Dies und die Entwicklung zusätzlicher Liganden zur Aktivierung der nukleären Rezeptoren FXR, PXR und CAR stellt ein interessantes Ziel künftiger Forschungen dar.

7. Literaturverzeichnis

1. **Lippert H**, Herbold D, Lippert-Burmester W. Anatomie Text und Atlas. München: Urban & Fischer; 2010: 202-209
2. **Koletzko B**. Kinderheilkunde und Jugendmedizin. Berlin, Heidelberg: Springer; 2004: 480-489
3. **Rassow J**, Hauser K, Netzer R, Deutzmann R. Duale Reihe Biochemie. Stuttgart: Thieme; 2012: 718-724, 740-743, 745-749
4. **Püschel G**, Kühn H, Kietzmann T, Höhne W, Christ B, Doenecke D, Koolman J. Taschenlehrbuch Biochemie. Stuttgart: Thieme; 2011: 797-811
5. **Kullak-Ublick GA**, Stieger B, Meier PJ. Enterohepatic Bile Salt Transporters in Normal Physiology and Liver Disease. Gastroenterology 2004; 126(1): 322-342
6. **Zollner G**, Trauner M. Nuclear receptors as therapeutic targets in cholestatic liver diseases. British Journal of Pharmacology 2009; 156(1): 7-27
7. **Kullak-Ublick GA**, Beuers U, Paumgartner G. Hepatobiliary transport. Journal of Hepatology 2000; 32(1): 3-18
8. **Boyer JL**. New perspectives for the treatment of cholestasis: Lessons from basic science applied clinically. Journal of Hepatology 2007; 46(3): 356-371
9. **Kullak-Ublick GA**, Becker MB. Regulation of Drug and Bile Salt Transporters in Liver and Intestine. Drug Metabolism Reviews 2003; 35(4): 305-317
10. **Gortner L**, Meyer S, Sitzmann FC. Duale Reihe Pädiatrie. Stuttgart: Thieme; 2012: 68-71, 76-84, 292-297
11. **Lüllmann-Rauch R**. Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart: Thieme; 2009: 393-408
12. **Dillon S**, Tobias JD. Ondansetron to Treat Pruritus Due to Cholestatic Jaundice. Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics 2013; 18(3): 241-246
13. **Hoerning A**, Raub S, Dechêne A et al. Diversity of Disorders Causing Neonatal Cholestasis – The Experience of a Tertiary Pediatric Center in Germany. Frontiers in Pediatrics 2014; 2(65)
14. **Feldman AG**, Sokol RJ. Neonatal Cholestasis. Neoreviews 2013; 14(2)
15. **Bari K**, Garcia-Tsao G. Treatment of portal hypertension. World Journal of Gastroenterology 2012; 18(11): 1166-1175
16. **Chardot C**. Biliary atresia. Orphanet Journal of Rare Diseases 2006; 1(28)
17. **Verkade HJ**, Bezerra JA, Davenport M et al. Biliary atresia and other cholestatic childhood diseases: Advances and future challenges. Journal of Hepatology 2016; 65(3): 631-642
18. **Yonem O**, Bayraktar Y. Clinical characteristics of Caroli's syndrome. World Journal of Gastroenterology 2007; 13(13): 1934-1937
19. **Molmenti EP**, Squires RH, Nagata D et al. Liver transplantation for cholestasis associated with cystic fibrosis in the pediatric population. Pediatric Transplantation 2003; 7(2): 93-97
20. **Mall MA**, Hartl D. CFTR: cystic fibrosis and beyond. European Respiratory Journal 2014; 44(4): 1042-1054

21. **Kobelska-Dubiel N**, Klincewicz B, Cichy W. Liver disease in cystic fibrosis. *Przegląd Gastroenterologiczny* 2014; 9(3): 136-141
22. **Pusl T**, Beuers U. Zertifizierte medizinische Fortbildung - Leitsymptom Juckreiz. *Deutsches Ärzteblatt* 2006; 103(21)
23. **Srivastava A**. Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology* 2014; 4(1): 25-36
24. **Lewis T**, Kuye S, Sherman A. Ursodeoxycholic acid versus phenobarbital for cholestasis in the Neonatal Intensive Care Unit. *BMC Pediatrics* 2018; 18(197)
25. **Bergasa NV**. Pruritus of Cholestasis. In: Carstens E, Akiyama T, editors. *Itch: Mechanisms and Treatment*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2014: (6)
26. **Trauner M**, Meier PJ, Boyer JL. Molecular pathogenesis of cholestasis. *New England Journal of Medicine* 1998; 339(17): 1217-1227
27. **Boyer JL**. Nuclear Receptor Ligands: Rational and Effective Therapy for Chronic Cholestatic Liver Disease. *Gastroenterology* 2005; 129(2): 735-740
28. **Denk GU**, Soroka CJ, Takeyama Y, Chen WS, Schuetz JD, Boyer JL. Multidrug resistance-associated protein 4 is up-regulated in liver but down-regulated in kidney in obstructive cholestasis in the rat. *Journal of Hepatology* 2004; 40(4): 585-591
29. **Zollner G**, Fickert P, Zenz R et al. Hepatobiliary Transporter Expression in Percutaneous Liver Biopsies of Patients With Cholestatic Liver Diseases. *Hepatology* 2001; 33(3): 633-646
30. **Zollner G**, Fickert P, Silbert D et al. Adaptive changes in hepatobiliary transporter expression in primary biliary cirrhosis. *Journal of Hepatology* 2003; 38(6): 717-727
31. **Keitel V**, Burdelski M, Warskulat U et al. Expression and Localization of Hepatobiliary Transport Proteins in Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis. *Hepatology* 2005; 41(5): 1160-1172
32. **Chen HL**, Liu YJ, Chen HL et al. Expression of Hepatocyte Transporter and Nuclear Receptors in Children With Early and Late-Stage Biliary Atresia. *Pediatric Research* 2008; 63(6): 667-673
33. **Marschall HU**, Wagner M, Zollner G et al. Complementary Stimulation of Hepatobiliary Transport and Detoxification Systems by Rifampicin and Ursodeoxycholic Acid in Humans. *Gastroenterology* 2005; 129(2): 476-485
34. **Hagenbuch N**, Reichel C, Stieger B et al. Effect of phenobarbital on the expression of bile salt and organic anion transporters of rat liver. *Journal of Hepatology* 2001; 34(6): 881-887
35. **Benson EA**, Eadon MT, Desta Z et al. Rifampicin Regulation of Drug Transporters Gene Expression and the Association of MicroRNAs in Human Hepatocytes. *Frontiers in Pharmacology* 2016; 7(111)
36. **Fickert P**, Zollner G, Fuchsbichler A et al. Effects of Ursodeoxycholic and Cholic Acid Feeding on Hepatocellular Transporter Expression in Mouse Liver. *Gastroenterology* 2001; 121(1): 170-183
37. **mirVANA™** miRNA Isolation Kit Part Number AM1560, AM1561 Protocol, Edition 01/2011
38. **Agilent 2100 Bioanalyzer: 2100 Expert User's Guide**, Manual Part Number G2946-90004, Waldbronn Germany, Edition 05/2005, S.46-49, S.87-103

39. Agilent RNA 6000 Nano Kit Guide, Manual Part Number G2938-90034 Rev. B., Agilent Technologies, Waldbronn Germany, Edition 07/2013
40. **Thomas M**, Bayha C, Vetter S, Hofmann U, Schwarz M, Zanger UM, Braeuning A. Activating and Inhibitory Functions of WNT/ β -Catenin in the Induction of Cytochromes P450 by Nuclear Receptors in HepaRG Cells. *Molecular Pharmacology* 2015; 87(6): 1013-1020
41. Real Time PCR Analysis – User Guide, Part Number 68000088 K1, Fluidigm Corporation, San Francisco CA, Edition 06/2015, S.16-21
42. **Spurgeon SL**, Jones RC, and Ramakrishnan R. High Throughput Gene Expression Measurement with Real Time PCR in a Microfluidic Dynamic Array. *PloS One* 2008; 3(2)
43. **Brosius L**. SPSS 24 für Dummies. Weinheim: WILEY-VCH; 2017: 183-184, 259-268
44. **Eckle-Kohler J**, Kohler M. Eine Einführung in die Statistik und ihre Anwendungen. Berlin: Springer; 2017: 45-55
45. **Krickhahn T**. Statistik für Naturwissenschaftler für dummies. Weinheim: WILEY-VCH 2017: 86-88, 122-129
46. **Jacquemin E**. Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*; 2012; 36(1): 26-35
47. **Scotet V**, Duguépéroux I, Saliou P. Evidence for decline in the incidence of cystic fibrosis: a 35-year observational study in Brittany, France. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2012; 7(14)
48. **Turnpenny PD**, Ellard S. Alagille syndrome: pathogenesis, diagnosis and management. *European Journal of Human Genetics* 2012; 20(3): 251-257
49. **Wang ZX**, Li YG, Wang RL et al. Clinical classification of Caroli's disease: an analysis of 30 patients. *HPB (Oxford)* 2015; 17(3): 278-283
50. **Bessho K**, Bezerra JA. Biliary atresia: Will blocking inflammation tame the disease? *Annual Review of Medicine* 2011; 62: 171-185
51. **Bill AH**, Haas JE, Foster GL. Biliary Atresia: histopathologic observations and reflections upon its natural history. *Journal of Pediatric Surgery* 1977; 12(6): 977-982
52. **Lai MW**, Chang MH, Hsu SC et al. Differential diagnosis of extrahepatic biliary atresia from neonatal hepatitis: a prospective study. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1994; 18(2): 121-127
53. **Arastéh K**, Baenkler HW, Bieber C, Brandt R, Thomas T. Duale Reihe Innere Medizin. Stuttgart: Thieme; 2013: 583
54. **Crofts DJ**, Michel VJ, Rigby AS, Tanner MS, Hall DM, Bonham JR. Assessment of stool colour in community management of prolonged jaundice in infancy. *Acta Paediatrica* 1999; 88(9): 969-974
55. **Chen SM**, Chang MH, Du JC et al. Screening for Biliary Atresia by Infant Stool Color Card in Taiwan. *Pediatrics* 2006; 117(4): 1147-1154
56. **Xu Y**, Clark JC, Aronow BJ et al. Transcriptional Adaption to Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Deficiency. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278: 7674-7682
57. **Lee G**, Piquette-Miller M. Cytokines Alter the Expression and Activity of the Multidrug Resistance Transporters in Human Hepatoma Cell Lines; Analysis Using RT-PCR and cDNA Microarrays. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2003. 92(11): 2152-2163

- 58. Fernandez C**, Buyse M, German-Fattal M, Gimenez F. Influence of the pro-inflammatory cytokines on P-glycoprotein expression and functionality. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2004, 7(3): 359-371
- 59. Piquette-Miller M**, Pak A, Kim H, Anari R, Shahzamani A. Decreased expression and activity of P-glycoprotein in rat liver during acute inflammation. *Pharmaceutical Research* 1998; 15(5): 706-711
- 60. Hofmann V**, Deeg KH, Hoyer PF. *Ultraschalldiagnostik in Pädiatrie und Kinderchirurgie*. Stuttgart: Thieme; 2005: 324

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Transportsysteme in Hepato-, Cholangio- und Enterozyten des Menschen	10
Abb. 2: Beispiel eines Elektropherogramms	30
Abb. 3: Charakteristischer Anstieg der Fluoreszenzintensität im Rahmen einer qRT-PCR (41)	32
Abb. 4: Beispiel eines Boxplotdiagramms	33
Abb. 5: Beispiel eines Streudiagramms mit einer Regressionsgeraden und dem dazugehörigen Pearson-Korrelationskoeffizient r	34
Abb. 6: Krankheitsverteilung bei cholestatischen Gewebeproben	37
Abb. 7: Genexpression basolateraler Aufnahmetransporter bei verschiedenen cholestatischen Erkrankungen und Vergleichsproben	46
Abb. 8: Genexpression kanalikulärer Effluxtransporter und des Cholangiozytentransporters CFTR bei verschiedenen cholestatischen Erkrankungen und Vergleichsproben	47
Abb. 9: Genexpression basolateraler Effluxtransporter bei verschiedenen cholestatischen Erkrankungen und Vergleichsproben	48
Abb. 10: Genexpression nukleärer Rezeptoren bei verschiedenen cholestatischen Erkrankungen und Vergleichsproben	49
Abb. 11: Korrelation der Genexpression des nukleären Rezeptors FXR mit der Genexpression von OATP2 und SHP	50
Abb. 12: Korrelation der Genexpression des nukleären Rezeptors SHP mit der Genexpression hepatobiliärer Transporter	51
Abb. 13: Korrelation der Genexpression des nukleären Rezeptors PXR mit der Genexpression hepatobiliärer Transporter	52
Abb. 14: Korrelation der Genexpression des nukleären Rezeptors CAR mit der Genexpression hepatobiliärer Transporter	53
Abb. 15: Korrelation von cholestatischen Laborparametern mit der Genexpression der nukleären Rezeptoren FXR und CAR	54
Abb. 16: Korrelation von Gesamt-Bilirubin mit der Genexpression hepatobiliärer Effluxtransporter	55
Abb. 17: Genexpression der basolateralen Aufnahmetransporter NTCP und OATP2 bei verschiedenen Schweregraden an Cholestase	57
Abb. 18: Genexpression kanalikulärer Transporter und des Cholangiozytentransporters CFTR bei verschiedenen Schweregraden an Cholestase	58
Abb. 19: Genexpression basolateraler Effluxtransporter und des nukleären Rezeptors SHP bei verschiedenen Schweregraden an Cholestase	59
Abb. 20: Genexpression kanalikulärer Transporter und des Cholangiozytentransporters CFTR bei verschiedenen Schweregraden an Inflammation	61
Abb. 21: Genexpression des basolateralen Transporters MRP4 und der nukleären Rezeptoren PXR und CAR bei verschiedenen Schweregraden an Inflammation	62
Abb. 22: Genexpression des Aufnahmetransporters OATP2 bei Kindern mit/ ohne Hautikterus	64

Abb. 23: Genexpression hepatobiliärer Transporter und nukleärer Rezeptoren bei Kindern mit/ ohne dunklem Urin oder acholischem Stuhl	65
Abb. 24: Genexpression hepatobiliärer Transporter und nukleärer Rezeptoren bei Kindern mit/ ohne Juckreiz	66
Abb. 25: Genexpression von NTCP und CAR bei Kindern mit/ ohne Ansprechen auf die Antipruritus-Medikation	67
Abb. 26: Genexpression nukleärer Rezeptoren und des Cholangiozytentransporters CFTR bei Kindern mit unterschiedlicher Antipruritus-Medikation	70
Abb. 27: Genexpression hepatobiliärer Transporter bei Kindern mit unterschiedlicher Antipruritus-Medikation	117

9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Krankheitsbilder bei cholestatischen Lebergewebeproben und Vergleichsproben.....	22
Tab. 2: Daten zur Charakterisierung der Gewebeproben	24
Tab. 3: Übersicht über die untersuchten Gene	32
Tab. 4: Klinische Parameter bei cholestatischen Erkrankungen und Vergleichsproben.....	38
Tab. 5: Histologische Parameter bei cholestatischen Erkrankungen und Vergleichsproben ..	40
Tab. 6: Laborchemische Parameter bei cholestatischen Erkrankungen und Vergleichsproben	41
Tab. 7: Ergebnisse des Fragebogens zu cholestatischen Symptomen	43
Tab. 8: Zusammenfassung der Genexpressionsunterschiede hepatobiliärer Transporter und nukleärer Rezeptoren zwischen verschiedenen cholestatischen Erkrankungen und Vergleichsproben.....	45
Tab. 9: Zusammenfassung der Genexpressionsunterschiede hepatobiliärer Transporter und nukleärer Rezeptoren bei verschiedenen Schweregraden an Cholestase.....	57
Tab. 10: Zusammenfassung der Genexpressionsunterschiede hepatobiliärer Transporter und nukleärer Rezeptoren bei verschiedenen Schweregraden an Inflammation	60
Tab. 11: Zusammenfassung der Genexpressionsunterschiede hepatobiliärer Transporter und nukleärer Rezeptoren bei Kindern mit/ ohne cholestatischen Symptomen	64
Tab. 12: Zusammenfassung der Genexpressionsunterschiede hepatobiliärer Transporter und nukleärer Rezeptoren bei Kindern mit unterschiedlicher Antipruritus-Medikation	69
Tab. 13: Signifikanzwerte zur Untersuchung von Genexpressionsunterschieden bei verschiedenen cholestatischen Erkrankungen und Vergleichsproben	111
Tab. 14: Pearson-Korrelationskoeffizienten zur Untersuchung der Korrelation der Genexpression von nukleären Rezeptoren und hepatobiliären Transportern	112
Tab. 15: Pearson-Korrelationskoeffizienten zur Untersuchung der Korrelation von cholestatischen Laborwerten mit der Genexpression hepatobiliärer Transporter und nukleärer Rezeptoren	113
Tab. 16: Signifikanzwerte zur Untersuchung von Genexpressionsunterschieden bei verschiedenen Schweregraden von Cholestase/Inflammation	114
Tab. 17: Signifikanzwerte zur Untersuchung von Genexpressionsunterschieden bei Kindern mit/ohne cholestatischen Symptomen.....	115
Tab. 18: Signifikanzwerte zur Untersuchung von Genexpressionsunterschieden bei Kindern mit unterschiedlicher Antipruritus-Medikation	118

10. Anhang

A. Aufklärungsschreiben und Einwilligungserklärung zur Nutzung von Daten und Gewebeproben



Universitätsklinikum Regensburg, 93042 Regensburg

Adresse der Familie

**Klinik und Poliklinik für
Kinder- und Jugendmedizin**

Direktor:
Prof. Dr. med. Michael Melter

Unser Zeichen: E-Mail:
kinderundjugendmedizin@ukr.de

☎ 0941 944-2001
📠 0941 944-2002

Regensburg, den

Liebe Mutter, lieber Vater,

bei **Vorname des Kindes** ist im Rahmen einer Lebertransplantation die eigene, kranke Leber entnommen worden. In diesem Zusammenhang sind Sie bereits von uns informiert worden, dass das entnommene Gewebe für diagnostische Zwecke im Bereich der medizinischen Versorgung Ihres Kindes aufbewahrt wurde.

Wir wenden uns heute an Sie, da wir gerne nicht mehr benötigtes Gewebe für Forschungsprojekte an unserer KUNO-Kinderklinik verwenden möchten. Ziel dieser Forschungsprojekte ist es die Erkennung und den Verlauf von Lebererkrankungen und die damit zusammenhängenden Organveränderungen besser zu verstehen. Wir versuchen damit die Diagnostik und die Therapie möglicherweise zukünftig zu verbessern. Für die an unserer Klinik durchgeführte medizinische Forschung ist die Nutzung menschlicher Bioproben eine wichtige Grundvoraussetzung.

Die Verwendung im Rahmen der Einwilligung dient ausschließlich der wissenschaftlichen Forschung und schließt die weitere Lagerung und gegebenenfalls die Weitergabe zu Untersuchungen auch an nicht universitäre Kooperationspartner ein. Die Nutzung des Gewebes für wissenschaftliche Zwecke hat keinerlei Einfluss auf die Behandlung oder Nachbehandlung Ihres Kindes. Eine Rückmeldung von Ergebnissen aus der rein experimentellen Untersuchung von Proben Ihres Kindes ist nicht vorgesehen. Aus der Lagerung bzw. Nutzung des Gewebes ergeben sich keinerlei gesundheitliche Risiken für Ihr Kind. Der Schutz Ihrer Privatsphäre und der Privatsphäre Ihres Kindes hat für die KUNO-Kinderklinik den höchsten Stellenwert.

Universitätsklinikum Regensburg
Anstalt des öffentlichen Rechts
Vorstand:
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Oliver Köhl (Vorsitzender)
Kaufmännischer Direktor: Dipl.-Kfm. Klaus Fischer
Pflegedirektor: Alfred Stockinger
Dekan der Fakultät für Medizin: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

Hausadresse
Universitätsklinikum Regensburg
Franz-Josef-Strauß-Allee 11
93053 Regensburg

ÖPNV: RVV Linien 6 und 19



Sie haben jederzeit und ohne Angabe von Gründen das Recht, ihre Einwilligung in die Nutzung von Proben und Daten gegenüber der KUNO-Kinderklinik zurückzuziehen. Dazu ist lediglich ein entsprechendes, von denselben Personen wie die Einwilligung unterzeichnetes Schreiben an die Adresse der KUNO-Kinderklinik erforderlich.

Falls Ihr Kind 14 Jahre oder älter bzw. in der Lage ist, die hier gegebene Informationen zu verstehen, sich ein eigenes Urteil zu bilden und somit eine eigene Einwilligungserklärung abzugeben, bitten wir um eine Unterschrift und die Information dazu auf der folgenden Einwilligungserklärung.

Wir bitten Sie die unterschriebene Einverständniserklärung und ausgefüllten Fragebogen mit dem beigelegten und frankierten Umschlag an unsere KUNO-Kinderklinik zurück zu senden.

Wir bedanken uns für Ihr entgegengebrachtes Vertrauen danken und verbleiben

mit freundlichen Grüßen

J. Vermehren
Funktionsoberarzt

Prof. Dr. med. M. Melter
Direktor der Klinik und Poliklinik
für Kinder- und Jugendmedizin

Universitätsklinikum Regensburg
Anstalt des öffentlichen Rechts
Vorstand:
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Oliver Kölbl (Vorsitzender)
Kaufmännischer Direktor: Dipl.-Kfm. Klaus Fischer
Pflegedirektor: Alfred Stockinger
Dekan der Fakultät für Medizin: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

Hausadresse
Universitätsklinikum Regensburg
Franz-Josef-Strauß-Allee 11
93053 Regensburg

ÖPNV: RVV Linien 6 und 19



**Einwilligungserklärung zur Nutzung von Gewebe (hier explantiertes Lebergewebe)
und zugehöriger Daten (Eltern / Patient Formular)**

- Das bereits von der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin von unserem Kind zur wissenschaftlichen Forschung überlassene Gewebe und mit zugehörigen Daten soll für folgende Forschungsprojekt verwendet werden:
 - Untersuchungen zur Expression (Vorhandensein) von regenerativen (selbst heilenden) Faktoren in der erkrankten Leber
 - Untersuchungen zum Metabolismus (Stoffwechsel) in der erkrankten Leber
- Mit unserer Unterschrift willigen wir ein, dass bereits gewonnenes Gewebematerial (hier explantierte Leber), Blut oder Blutbestandteile für die genannten wissenschaftlichen Zwecke verwendet werden kann.
- Mit der Verarbeitung und Nutzung der personenbezogenen Daten durch die Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin gemäß den gegebenen Informationen sind wir einverstanden. Dies gilt auch für personenbezogene Daten, die zu einem späteren Zeitpunkt aus den Proben gewonnen und weiterverarbeitet werden.
- Unsere Einwilligung erfolgt freiwillig. Wir wurden über unser **Recht zum Widerruf** der Einwilligung zur Nutzung von Proben und Daten aufgeklärt und sind mit den im Anschreiben geschilderten Verfahren und Einschränkungen einverstanden.
- Wir haben auch die weiteren im Anschreiben gegebenen Erläuterungen verstanden. Darüber hinausgehende Fragen können jederzeit von Ärzten der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin beantwortet werden (siehe Adresse im Anschreiben).
- **Angaben zum Kind:**
 - ☐ Unser Kind ist inzwischen volljährig.
 - ☐ Unser Kind ist in der Lage die gegebenen Informationen ggf. in entsprechend angepasster Form zu verstehen, sich ein eigenes Urteil zu bilden und somit diese Einwilligungserklärung selbst abzugeben.

Ort, Datum

Name des Patienten / Kindes
(in Druckbuchstaben)

Unterschrift Mutter

Unterschrift Vater

Unterschrift Patient / Kind

Universitätsklinikum Regensburg
Anstalt des öffentlichen Rechts
Vorstand:
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Oliver Kölbl (Vorsitzender)
Kaufmännischer Direktor: Dipl.-Kfm. Klaus Fischer
Pflegedirektor: Alfred Stockinger
Dekan der Fakultät für Medizin: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

Hausadresse
Universitätsklinikum Regensburg
Franz-Josef-Strauß-Allee 11
93053 Regensburg

ÖPNV: RVV Linien 6 und 19



B. Fragebogen zu cholestatischen Symptomen

Fragebogen

Name des Patienten / Kindes
(in Druckbuchstaben)

Bitte beantworten Sie die folgenden Fragen entsprechend Ihrer Erinnerung. Falls Sie sich an Einzelheiten nicht mehr erinnern können, überspringen Sie die entsprechende Frage einfach und machen keine Angaben.

Haben Sie im Rahmen der Erkrankung *Ihres Sohnes/ Ihrer Tochter* vor der Lebertransplantation die folgenden Symptome bei Ihrem Kind bemerkt?

Gelbfärbung der Haut	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
Gelbfärbung der Augen	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
Intensive Gelb- oder Braunfärbung des Urins	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
Aufhellung des Stuhls (siehe Kuno-Kids-Farbkarte)	ja <input type="checkbox"/> Nr.	nein <input type="checkbox"/>

Juckreiz ☐ ja ☐ nein ☐

- ☐ War dieser Juckreiz am ganzen Körper ☐ ja ☐ nein ☐
- ☐ oder auf eine Körperregion beschränkt? ☐ ja, und zwar: _____
☐ nein
- ☐ Waren Hautveränderungen sichtbar?
(Ausschlag, Kratzspuren, aufgekratzte Hautstellen) ☐ ja, und zwar: _____
☐ nein

Ihr Kind hat im Rahmen der Behandlung *Ursodeoxycholsäure/ Phenobarbital/ Rifampicin* zur Linderung des Juckreizes / zur Juckreizprophylaxe erhalten. Konnten Sie daraufhin eine Besserung des Juckreizes bei Ihrem Kind feststellen?

☐ ja ☐ nein

Vielen Dank für Ihre Mithilfe!



Universitätsklinikum Regensburg
Anstalt des öffentlichen Rechts
Vorstand:
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Oliver Kölbl (Vorsitzender)
Kaufmännischer Direktor: Dipl.-Kfm. Klaus Fischer
Pflegedirektor: Alfred Stodding
Dekan der Fakultät für Medizin: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

Hausadresse
Universitätsklinikum Regensburg
Franz-Josef-Strauß-Allee 11
93053 Regensburg

ÖPNV: RVM Linien 6 und 19

C. Normalwerte der Milz im Längsdurchmesser

Tabelle 9.1 Normalwerte der Milz im Längsdurchmesser (40)

Alter	Längsdurchmesser (cm)
3 Monate	bis 6
1 Jahr	bis 7
2 Jahre	bis 8
4 Jahre	bis 9
8 Jahre	bis 10
10 Jahre	bis 11
>14 Jahre	12

(60)

D. Kuno-Kids-Stuhlfarbkarte

Liebe Eltern,

Sie finden im gelben Vorsorgeheft Ihres Kindes diese Beilage, die üblicherweise diesem nicht beiliegt. Bei Neugeborenen ist eine Gelbverfärbung der Haut und/ oder der Augen sehr häufig und ganz normal. In seltenen Fällen kann die Gelbverfärbung aber auch einmal Ausdruck einer Leber- oder Gallenwegerkrankung sein. Eine solche Erkrankung muss früh erkannt werden. Dazu ist es sehr hilfreich regelmäßig die Farbe des Stuhls Ihres Kindes zu beurteilen. Wir möchten Sie daher bitten von jetzt an bis ihr Kind 4 Wochen alt ist, die Stuhlfarbe Ihres Kindes anhand der unten abgebildeten Farbskala zu beurteilen. Auf der linken Skala finden sich „normale“, rechts „verdächtige“ Stuhlfarben. Bitte machen Sie für jeden verdächtigen Stuhl einen Strich in das dafür vorgesehene Feld (s.u.). Der Urin bei Neugeborenen ist meist „wasserklar“. Bei Leber- oder Gallenwegerkrankungen findet er sich aber oft gelb gefärbt (wie bei Erwachsenen normal). Machen Sie bitte unten ein Kreuz wenn das bei Ihrem Kind der Fall ist.

Ist die Urin- und/oder Stuhlfarbe mehr als 2 Mal „verdächtig“, lassen Sie bitte zeitnah (gleich) bei Ihrem Kinder-/Hausarzt oder in der KUNO-Klinik St. Hedwig den gelben Farbstoff im Blut „differenziert“ (direktes Bilirubin) messen.

Herzlichen Dank

Ihr KUNO-Team aus Regensburg



	„normaler“ Stuhl		„verdächtiger“ Stuhl

Modifiziert und mit Genehmigung der Children's Liver Disease Foundation, UK

Bitte machen Sie hier ein Kreuz, wenn der Urin Ihres Kindes mehr als 2 Mal deutlich gelb gefärbt war.

☐

Mit freundlicher Unterstützung durch



Bitte machen Sie in dieses Feld einen Strich für jeden Stuhl mit einer „verdächtigen“ Farbe.

E. Signifikanzwerte zur Untersuchung von Genexpressionsunterschieden bei verschiedenen cholestatischen Erkrankungen und Vergleichsproben (Kap. 4.2.)

Tab. 13: Signifikanzwerte zur Untersuchung von Genexpressionsunterschieden bei verschiedenen cholestatischen Erkrankungen und Vergleichsproben

Cholestatische Erkrankung	BA (n = 56)	CF (n = 7)	PFIC (n = 4)	ALGS (n = 2)	CS (n = 1)
NTCP	0,006	0,902	0,648	0,333	0,250
OATP2	0,000	0,902	0,024	0,056	0,250
MRP2	0,082	0,456	0,648	0,056	0,250
MDR1	0,000	0,620	0,024	0,056	0,250
MDR3	0,001	0,535	0,006	0,056	0,250
FIC1	0,000	0,209	0,109	0,111	0,250
CFTR	0,000	0,318	0,230	0,333	0,250
MRP3	0,060	1,000	1,000	0,111	0,250
MRP4	0,000	0,097	0,024	0,056	0,250
OSTα/β	0,005	0,710	0,024	0,056	0,250
FXR	0,906	0,805	0,527	1,000	0,250
SHP	0,360	0,383	0,412	0,500	1,000
PXR	0,009	0,456	0,315	0,500	0,750
CAR	0,015	0,259	0,412	0,333	0,500

Dargestellt sind die Signifikanzwerte der Genexpressionsunterschiede hepatobiliärer Transporter und nukleärer Rezeptoren bei den verschiedenen cholestatischen Krankheitsbildern jeweils im Vergleich zu den Kontrollproben (VP) mit n = 7. Ein p-Wert < 0,05 galt als statistisch signifikant und ist in der Tabelle mit dicker Umrandung gekennzeichnet.

BA = Biliäre Atresie/ Extrahepatische Gallengangatresie, CF = Cystische Fibrose, PFIC = Progressive Intrahepatische Cholestase, ALGS = Alagille-Syndrom, CS = Caroli-Syndrom, NTCP = Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide, OATP = Organic-Anion-Transporting-Polypeptide, MRP = Multidrug-Resistance-Related-Protein, MDR = Multiple-Drug-Resistance-Protein, FIC = Familial-Intrahepatic-Cholestasis-Protein, CFTR = Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator, OST = Organic-Solute-Transporter, FXR = Farnesoid-X-Rezeptor, SHP = Small-Heterodimer-Partner, PXR = Pregnane-X-Rezeptor, CAR = Constitutive-Androstane-Rezeptor.

F. Pearson-Korrelationskoeffizienten zur Untersuchung der Korrelation der Genexpression von nukleären Rezeptoren und hepatobiliären Transportern (Kap. 4.3.)

Tab. 14: Pearson-Korrelationskoeffizienten zur Untersuchung der Korrelation der Genexpression von nukleären Rezeptoren und hepatobiliären Transportern

	FXR	SHP	PXR	CAR
NTCP	+0,335	+0,227	+0,681	+0,729
OATP2	+0,597	+0,086	+0,602	+0,420
MRP2	+0,436	+0,416	+0,366	+0,282
MDR1	+0,377	+0,301	-0,184	-0,238
MDR3	+0,409	+0,569	-0,163	+0,278
FIC1	+0,372	+0,543	-0,040	-0,111
CFTR	+0,061	+0,056	-0,352	-0,364
MRP3	+0,403	+0,503	+0,191	-0,026
MRP4	+0,141	+0,104	-0,304	-0,395
OSTα/β	+0,244	+0,562	+0,176	+0,256
FXR	-	+0,331	-	-

Dargestellt sind die Pearson-Korrelationskoeffizienten r . Bei Werten $\geq 0,5$ und $\leq -0,5$ wird von einem deutlich positiven/ negativen linearen Zusammenhang ausgegangen, was in der Tabelle durch eine dicke Umrandung gekennzeichnet ist. $n = 84$.

FXR = Farnesoid-X-Rezeptor, SHP = Small-Heterodimer-Partner, PXR = Pregnane-X-Rezeptor, CAR = Constitutive-Androstane-Rezeptor, NTCP = Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide, OATP = Organic-Anion-Transporting-Polypeptide, MRP = Multidrug-Resistance-Related-Protein, MDR = Multiple-Drug-Resistance-Protein, FIC = Familial-Intrahepatic-Cholestasis-Protein, CFTR = Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator, OST = Organic-Solute-Transporter.

G. Pearson-Korrelationskoeffizienten zur Untersuchung der Korrelation von cholestatischen Laborwerten mit der Genexpression hepatobiliärer Transporter und nukleärer Rezeptoren (Kap. 4.4.1.)

Tab. 15: Pearson-Korrelationskoeffizienten zur Untersuchung der Korrelation von cholestatischen Laborwerten mit der Genexpression hepatobiliärer Transporter und nukleärer Rezeptoren

	Bili direkt (n = 69)	Bili gesamt (n = 84)	GS Glyko (n = 56)	GS Tauro (n = 56)	GS gesamt (n = 57)
NTCP	-0,477	-0,486	-0,259	-0,463	-0,350
OATP2	-0,238	-0,321	-0,351	-0,443	-0,410
MRP2	+0,102	+0,140	-0,042	-0,127	-0,082
MDR1	+0,612	+0,643	+0,431	+0,538	+0,484
MDR3	+0,148	+0,247	+0,187	+0,172	+0,191
FIC1	+0,479	+0,560	+0,230	+0,429	+0,303
CFTR	+0,477	+0,495	+0,302	+0,483	+0,378
MRP3	+0,569	+0,623	+0,286	+0,258	+0,276
MRP4	+0,560	+0,605	+0,261	+0,406	+0,319
OSTα/β	+0,344	+0,429	+0,216	+0,255	+0,235
FXR	+0,141	+0,114	+0,011	-0,084	-0,029
SHP	+0,256	+0,259	+0,009	+0,066	+0,021
PXR	-0,240	-0,270	-0,163	-0,370	-0,248
CAR	-0,366	-0,347	-0,146	-0,277	-0,203

Dargestellt sind die Pearson-Korrelationskoeffizienten r. Bei Werten $\geq 0,5$ und $\leq -0,5$ wird von einem deutlich positiven/ negativen linearen Zusammenhang ausgegangen, was in der Tabelle durch eine dicke Umrandung gekennzeichnet ist.

Bili = Bilirubin, GS = Gallensäuren, NTCP = Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide, OATP = Organic-Anion-Transporting-Polypeptide, MRP = Multidrug-Resistance-Related-Protein, MDR = Multiple-Drug-Resistance-Protein, FIC = Familial-Intrahepatic-Cholestasis-Protein, CFTR = Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator, OST = Organic-Solute-Transporter, FXR = Farnesoid-X-Rezeptor, SHP = Small-Heterodimer-Partner, PXR = Pregnane-X-Rezeptor, CAR = Constitutive-Androstane-Rezeptor.

H. Signifikanzwerte zur Untersuchung von Genexpressionsunterschieden bei verschiedenen Schweregraden von Cholestase/Inflammation (Kap. 4.4.2.)

Tab. 16: Signifikanzwerte zur Untersuchung von Genexpressionsunterschieden bei verschiedenen Schweregraden von Cholestase/Inflammation

Cholestasegrad	leicht (n = 7)	mittel (n = 3)	schwer (n = 40)
NTCP	0,174	0,727	0,010
OATP2	0,071	0,064	0,015
MRP2	0,210	0,864	0,829
MDR1	0,174	0,100	0,000
MDR3	0,210	0,145	0,024
FIC1	0,174	0,064	0,000
CFTR	0,252	0,482	0,000
MRP3	1,000	0,373	0,002
MRP4	0,142	0,282	0,000
OST α/β	0,606	0,100	0,004
FXR	0,606	0,482	0,245
SHP	0,536	0,209	0,019
PXR	0,071	0,864	0,245
CAR	0,408	0,864	0,408
Inflamationsgrad	leicht (n = 33)	mittel (n = 6)	schwer (n = 4)
NTCP	0,376	0,884	0,104
OATP2	0,406	0,350	0,056
MRP2	0,915	0,591	0,571
MDR1	0,002	0,002	0,018
MDR3	0,321	0,005	0,949
FIC1	0,003	0,015	0,010
CFTR	0,010	0,301	0,056
MRP3	0,248	0,078	0,661
MRP4	0,023	0,122	0,018
OST α/β	0,391	0,078	0,661
FXR	0,810	0,525	0,412
SHP	0,117	0,062	1,000
PXR	0,348	0,733	0,006
CAR	0,650	0,808	0,018

Dargestellt sind die Signifikanzwerte der Genexpressionsunterschiede bei unterschiedlichen Cholestase-/Inflamationsgraden jeweils im Vergleich zum Stadium „keine Cholestase“ (n = 9) / „keine Inflammation“ (n = 11). Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen und ist in der Tabelle mit dicker Umrandung gekennzeichnet.

NTCP = Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide, OATP = Organic-Anion-Transporting-Polypeptide, MRP = Multidrug-Resistance-Related-Protein, MDR = Multiple-Drug-Resistance-Protein, FIC = Familial-Intrahepatic-Cholestasis-Protein, CFTR = Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator, OST = Organic-Solute-Transporter, FXR = Farnesoid-X-Rezeptor, SHP = Small-Heterodimer-Partner, PXR = Pregnane-X-Rezeptor, CAR = Constitutive-Androstane-Rezeptor.

I. Signifikanzwerte zur Untersuchung von Genexpressionsunterschieden bei Kindern mit/ ohne cholestatischen Symptomen (Kap. 4.4.3.)

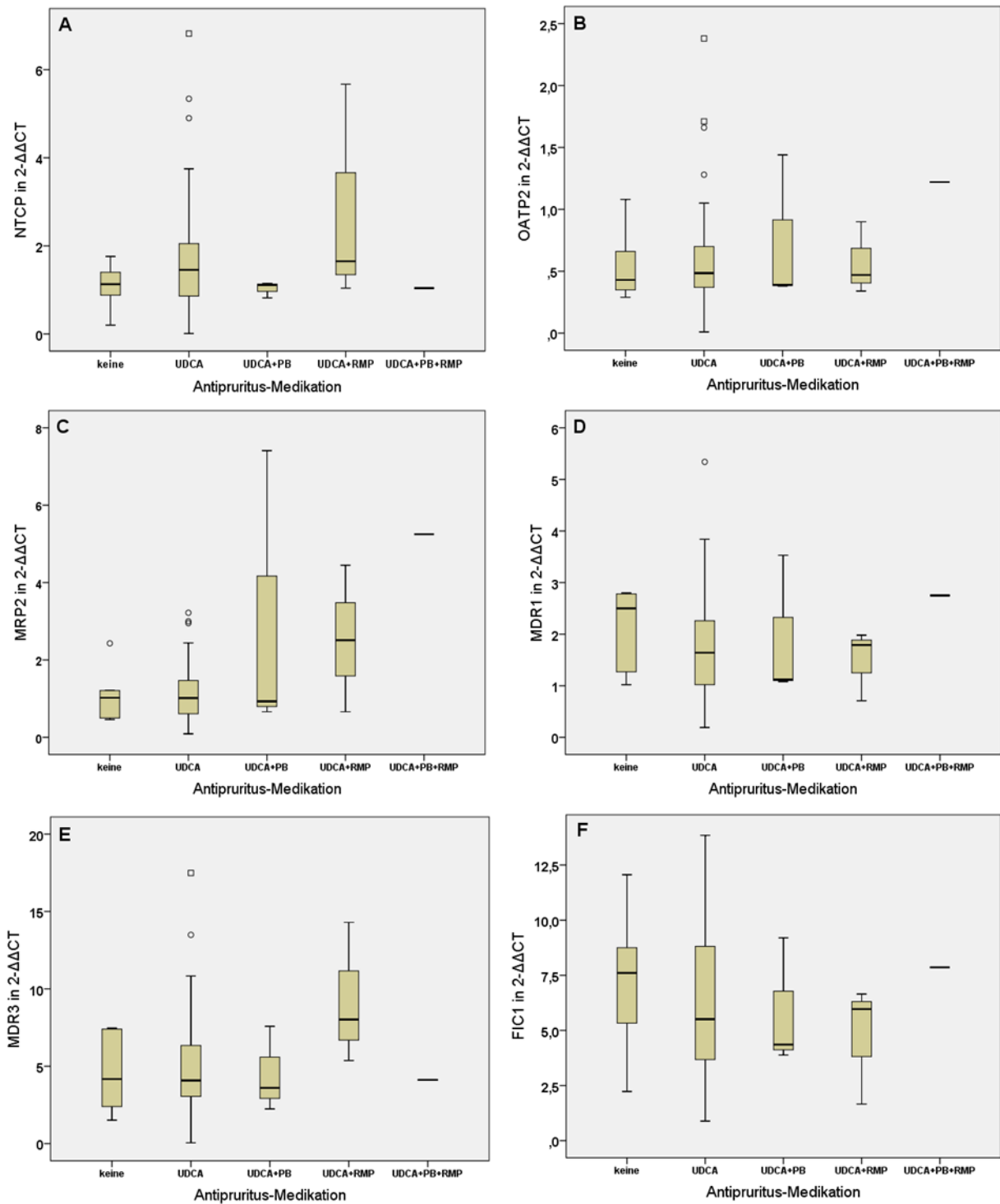
Tab. 17: Signifikanzwerte zur Untersuchung von Genexpressionsunterschieden bei Kindern mit/ohne cholestatischen Symptomen

	Haut- ikterus j (n=17) / n (n=10)	Skleren- ikterus j (n=22) / n (n=5)	dunkler Urin j (n=14) / n (n=11)	acholischer Stuhl j (n=22) / n (n=4)	Juckreiz j (n=14) / n (n=13)	Ansprechen auf Antipruritus- Medikation j (n=4) / n (n=10)
NTCP	0,443	0,650	0,373	0,252	0,061	0,036
OATP2	0,023	0,033	0,018	0,223	0,720	0,454
MRP2	1,000	0,694	0,767	0,864	0,259	0,539
MDR1	0,473	0,129	0,183	0,607	0,025	0,142
MDR3	0,749	0,186	0,291	0,515	0,616	0,054
FIC1	0,473	0,832	0,727	0,130	0,003	0,839
CFTR	0,863	0,447	0,373	0,706	0,003	0,635
MRP3	0,863	0,485	0,149	0,389	0,116	0,635
MRP4	0,786	0,377	0,267	0,352	0,048	1,000
OST α/β	0,204	0,146	0,021	0,607	0,943	0,188
FXR	0,115	0,146	0,033	0,021	0,756	0,733
SHP	0,908	0,232	0,467	0,429	0,350	0,106
PXR	0,863	0,786	0,244	0,758	0,043	0,539
CAR	0,604	0,284	0,183	0,515	0,259	0,036

Dargestellt sind die Signifikanzwerte der Genexpressionsunterschiede bei verschiedenen cholestatischen Symptomen jeweils im Vergleich zu Kindern ohne das jeweilige Symptom. Ein p-Wert < 0,05 gilt als statistisch signifikant und ist in der Tabelle mit dicker Umrandung gekennzeichnet.

j = ja, n = nein, NTCP = Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide, OATP = Organic-Anion-Transporting-Polypeptide, MRP = Multidrug-Resistance-Related-Protein, MDR = Multiple-Drug-Resistance-Protein, FIC = Familial-Intrahepatic-Cholestasis-Protein, CFTR = Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator, OST = Organic-Solute-Transporter, FXR = Farnesoid-X-Rezeptor, SHP = Small-Heterodimer-Partner, PXR = Pregnane-X-Rezeptor, CAR = Constitutive-Androstane-Rezeptor.

J. Genexpression hepatobiliärer Transporter bei Kindern mit unterschiedlicher Antipruritus-Medikation



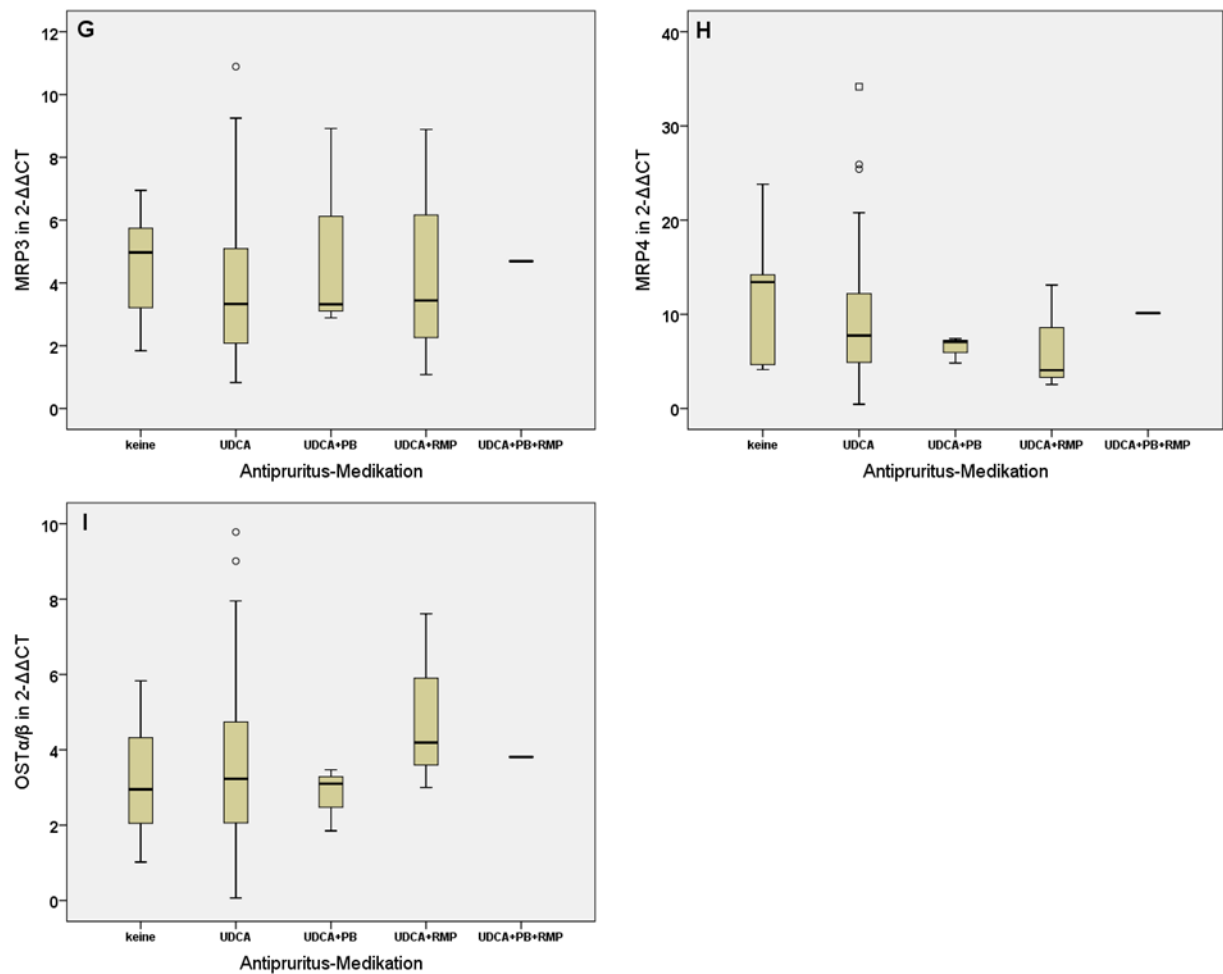


Abb. 27: Genexpression hepatobiliärer Transporter bei Kindern mit unterschiedlicher Antipruritus-Medikation

*/ ** = bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ / $p < 0,01$ im Vergleich zur Gruppe „kein Medikament“ ($n = 6$) signifikant unterschiedlich. UDCA: $n = 62$, UDCA+PB: $n = 3$, UDCA+RMP: $n = 3$, UDCA+PB+RMP: $n = 1$. NTCP = Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide, OATP = Organic-Anion-Transporting-Polypeptide, MRP = Multidrug-Resistance-Related-Protein, MDR = Multiple-Drug-Resistance-Protein, FIC = Familial-Intrahepatic-Cholestasis-Protein, OST = Organic-Solute-Transporter, UDCA = Ursodeoxycholsäure, PB = Phenobarbital, RMP = Rifampicin.

K. Signifikanzwerte zur Untersuchung von Genexpressionsunterschieden bei Kindern mit unterschiedlicher Antipruritus-Medikation

Tab. 18: Signifikanzwerte zur Untersuchung von Genexpressionsunterschieden bei Kindern mit unterschiedlicher Antipruritus-Medikation

Medikamentengruppe	UDCA (n = 62)	UDCA + PB (n = 3)	UDCA+RMP (n = 3)	UDCA + PB + RMP (n = 1)
NTCP	0,245	0,714	0,262	1,000
OATP2	0,744	0,714	1,000	0,286
MRP2	0,825	1,000	0,262	0,286
MDR1	0,283	0,905	0,262	1,000
MDR3	1,000	1,000	0,095	1,000
FIC1	0,427	0,714	0,262	1,000
CFTR	0,323	0,024	0,024	1,000
MRP3	0,245	1,000	0,905	0,857
MRP4	0,264	0,548	0,167	0,857
OST α/β	0,760	0,905	0,381	1,000
FXR	0,908	0,548	0,548	1,000
SHP	0,167	0,714	1,000	0,571
PXR	0,665	0,381	0,095	1,000
CAR	0,620	0,548	0,381	0,286

Dargestellt sind die Signifikanzwerte der Genexpressionsunterschiede bei verschiedenen Medikamentengruppen jeweils im Vergleich zur Gruppe „kein Medikament“ (n = 6). Ein p-Wert < 0,05 gilt als statistisch signifikant und ist in der Tabelle mit dicker Umrandung gekennzeichnet.

UDCA = Ursodeoxycholsäure, PB = Phenobarbital, RMP = Rifampicin, NTCP = Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide, OATP = Organic-Anion-Transporting-Polypeptide, MRP = Multidrug-Resistance-Related-Protein, MDR = Multiple-Drug-Resistance-Protein, FIC = Familial-Intrahepatic-Cholestasis-Protein, CFTR = Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator, OST = Organic-Solute-Transporter, FXR = Farnesoid-X-Rezeptor, SHP = Small-Heterodimer-Partner, PXR = Pregnane-X-Rezeptor, CAR = Constitutive-Androstane-Rezeptor.

11. Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Thomas Weiß für seine exzellente Arbeit als Betreuer danken. Für die Flexibilität und Freiheit, die er mir in der Gestaltung meines Themas zugestanden hat und dafür, dass Gespräche stets zeitnah möglich waren. Fragen sind so nie lange offen geblieben und wurden jederzeit mit guten Ideen, interessanten Diskussionen und hilfreichen, fachlichen Tipps beantwortet.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Michael Melter dafür, dass ich meine Dissertation an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin am Uniklinikum Regensburg schreiben durfte. Ich danke für die Unterstützung im Rahmen der Erstellung und Versendung der Fragebögen und für das Bereitstellen der Kuno-Kids-Stuhlfarbkarten.

Rania Dayoub und Susanne Heyn danke ich für die Hilfe im Laboralltag, für die Unterstützung im Rahmen der Auswertung der gewonnenen Daten und für zahlreiche nette und bereichernde Gespräche zwischendurch.

Aylin Sahin danke ich dafür, dass ich einige, von ihr isolierte Kindergewebeproben zur weiteren Genexpressionsmessung und Auswertung nutzen durfte.

Janine Zeidler danke ich für die Unterstützung im Rahmen der klinischen Datengewinnung und für das schnelle Beantworten von Anfragen.

Weiterhin gilt mein Dank dem Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut in Stuttgart, insbesondere den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Ulrich Zanger und Dr. Maria Thomas für das Durchführen der qRT-PCR und der Genexpressionsmessung.

Mein besonderer Dank gilt außerdem meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich in all den Jahren meines Studiums bedingungslos unterstützt haben, immer mit viel Rat und Verständnis an meiner Seite standen und so mein Studium und diese Dissertation erst möglich gemacht haben.

Auch meinem Freund Tim Heitmann möchte ich von ganzem Herzen danken. Seine aufmunternden Worte, das Probelesen und seine hilfreichen Tipps zu Formatierung und wissenschaftlichem Arbeiten waren jederzeit Gold wert und haben in den vergangenen vier Jahren viel zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.